NAD-abhängige 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase aus Humanplacenta

Isolierung, Charakterisierung und enzymkinetische Studien zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Franz Rückrich
aus Bad Kreuznach

1978

78 528

NAD-ABHÄNGIGE 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE AUS HUMANPLACENTA

ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG UND ENZYMKINETISCHE STUDIEN ZUR AUFKLÄRUNG DES REAKTIONSMECHANISMUS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Franz Rückrich
aus Bad Kreuznach

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. April 1978

Dekan: Prof. Dr. W. Zeil
1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Guglielmi
2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Weser

A b s t r a c t

RÜCKRICH, MICHAEL Franz:

NAD-ABHÄNGIGE 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE AUS HUMANPLACENTA. ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG UND ENZYMKINETISCHE STUDIEN ZUR AUFKLÄRUNG DES REAKTIONSMECHANISMUS

Das Enzym wurde, bezogen auf den 17000xg-Überstand des Placentahomogenats, ca. 10000-fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 43 IU/mg Protein angereichert (10% Ausbeute). Analytische Polyacrylamid-Disk-Elektrophoresen zeigten eine - allerdings äußerst schwache - Proteinbande. Diese korrespondierte mit einer entsprechenden Aktivitätsanfärbung. Durch Gelfiltration über Sephadex G-100 wurde ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 52000 ermittelt. Lipide und nichtionische Detergenzien führten zu einer signifikanten Beeinflussung der Aktivität des hochgereinigten Enzyms. Diese war für Triton X-100 bei seiner kritischen Micellenkonzentration halbmaximal.

Für enzymkinetische Studien wurden die Bedingungen des enzymatischen Tests (NADH-Messung) optimiert und 100mM Triäthanolaminpuffer, pH 7.4 und 37°C gewählt. Vollständige Anfangsgeschwindigkeitsmuster wurden für NAD und einige Prostaglandine (PG) bzw. PG-Endoperoxid-Analoge erstellt und die kinetischen Konstanten mittels Computer durch gewichtete lineare Regressionsanalyse erhalten. Bei sehr hohen Konzentrationen zeigen PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ eine "Aktivierung" und PGE_1 Substrathemmung, während NADH zu einer kompetitiven Substrathemmung der Rückreaktion führt. Abgesehen von diesen Effekten berechtigen die konvergierenden doppelt reziproken Primärdiagramme der Kreuzserien der Hin- und Rückreaktion, das vollständige Produktinhibitionsmuster der Hinreaktion, die Messungen mit Substrat- und Produktanalogen und die Relationen der kinetischen Konstanten zur Aussage: das Enzym folgt kinetisch einem Ordered Bi Bi Mechanismus mit NAD als führendem Substrat. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Hinreaktion sollte für einige PG die Dissoziation des E·NADH-Komplexes sein.

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Dr. A. Jung im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel und Herrn Prof. Dr. J. Guglielmi danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. A. Jung für die Betreuung der Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. A. Wendel danke ich für die Überlassung des Computerprogramms und die Einführung in die Enzymkinetik.

Herr Dr. W. Schlegel, Herr Prof. Dr. H.J. Fromm und Herr Dr. H. Bisswanger gaben interessante Diskussionsbeiträge.

Herrn Dr. U.F. Axen und Herrn Dr. G.L. Bundy (Upjohn Company), Herrn Dr. Brunnberg und Herrn Dr. Kordian (Upjohn GmbH), Herrn Dr. N.S. Crossley (ICI) und Herrn Prof. Dr. U. Weser danke ich für die Überlassung von Materialien und Geräten.

Meiner Frau Marita gewidmet

Herzlichen Dank für außerordentliches
Verständnis, ständige Unterstützung
und uneigennützige Hilfe bei der
Anfertigung des Manuskripts

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL	16
2.1.	GERÄTE	16
2.2.	CHROMATOGRAPHIE- UND FILTRIERMATERIAL	16
2.3.	CHEMIKALIEN	17
2.3.1.	Prostaglandine und Analoge	17
2.3.2.	Nucleotide	18
2.3.3.	Proteine	18
2.3.4.	Sonstige Chemikalien	18
2.4.	HUMANPLACENTEN	19
3.	METHODEN	20
3.1.	AKTIVITÄTSTEST FÜR NAD-ABHÄNGIGE 15-HYDROXY-PROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE UND ENZYMEINHEITEN	20
3.1.1.	Standardtest	20
3.1.2.	Test für internationale Einheiten	21
3.1.3.	Enzymeinheiten	21
3.2.	ISOLIERUNG EINER NAD-ABHÄNGIGEN 15-HYDROXYPRO-STAGLANDIN-DEHYDROGENASE AUS HUMANPLACENTA	22
3.2.1.	Proteinbestimmungen	22
3.2.2.	Phosphatbestimmung	24
3.2.3.	Pufferlösungen	24
3.2.4.	Aufarbeitung der Placenten	25
3.2.5.	pH5-Fällung	25
3.2.6.	Sephadex-G-50/DEAE-Cellulose-Chromatographie	26
3.2.7.	Ammoniumsulfatfällung	26
3.2.8.	Sephadex-G-100-Chromatographie	27
3.2.9.	DEAE-Sephadex-A-50-Chromatographie	27
3.2.10.	Hydrophobe Chromatographie	28
3.2.11.	Analytische Disk-Elektrophorese	29
3.2.12.	Versuche zur Affinitätschromatographie	30
3.3.	KONTROLLUNTERSUCHUNGEN	30
3.3.1.	Reinheitskontrolle der Prostaglandine durch Dünnschichtchromatographie	30
3.3.2.	Auftrennung von Reaktionsgemischen durch Dünnschichtchromatographie	31
3.3.3.	UV-VIS-Spektren	32

Seite

3.3.4. Optische Tests zur Untersuchung von Enzymfraktionen auf "Fremdaktivitäten" 32

3.4. UNTERSUCHUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG EINER 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE 33

3.4.1. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration 33

3.4.2. Stabilisierung durch NAD und Stabilität des Enzyms 33

3.4.3. Beeinflussung der enzymatischen Aktivität durch verschiedene Faktoren 34

3.5. STEADY-STATE-UNTERSUCHUNGEN DER HINREAKTION EINER 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE 35

3.5.1. Nomenklatur und Abkürzungen enzymkinetischer Größen und Begriffe 35

3.5.2. Durchführung der kinetischen Messungen 36

3.5.3. Auswertung der kinetischen Messungen 37

3.6. STEADY-STATE-UNTERSUCHUNGEN ZUR RÜCKREAKTION EINER 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE 39

3.6.1. Durchführung der kinetischen Messungen 39

3.6.2. Auswertung der kinetischen Messungen 40

3.6.3. Berechnung der Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten 40

4. ERGEBNISSE 41

4.1. AKTIVITÄTSTEST FÜR NAD-ABHÄNGIGE 15-HYDROXY-PROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE 41

4.2. ISOLIERUNG EINER NAD-ABHÄNGIGEN 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE AUS HUMANPLACENTA 41

4.2.1. Ausgangswerte und Anreicherung des Enzyms 41

4.2.2. Einzelergebnisse einiger Anreicherungsschritte 42

4.2.3. Hydrophobe Chromatographien 45

4.2.4. Analytische Disk-Elektrophoresen 49

4.2.5. Versuche zur Affinitätschromatographie 49

4.3. KONTROLLUNTERSUCHUNGEN 50

4.3.1. Reinheitskontrolle der Prostaglandine 50

4.3.2. Überprüfung der Produkte der enzymatischen Reaktion 50

4.3.3. UV-VIS-Spektren 52

4.3.4. Fremdaktivitäten in Enzymfraktionen 52

4.4. UNTERSUCHUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG EINER 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE 53

4.4.1. Molekulargewicht durch Gelfiltration 53

		Seite
4.4.2.	Stabilität und Stabilisierung des Enzyms	55
4.4.3.	Einfluß von Puffern und Salzen auf die enzymatische Aktivität	55
4.4.4.	pH-Abhängigkeit	56
4.4.5.	Temperaturabhängigkeit	61
4.4.6.	Äthanol und Glycerin als Inhibitoren	61
4.4.7.	Einfluß von Detergenzien, Lipiden und anderen Substanzen auf die enzymatische Aktivität	64
4.5.	STEADY-STATE-UNTERSUCHUNGEN DER HINREAKTION EINER 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE	68
4.5.1.	Prostaglandine und Endoperoxidanaloge als Substrate	68
4.5.2.	Prostaglandin D2 und Thromboxan B2 als Substrate	84
4.5.3.	Prostaglandinanaloge und Prostaglandin B1 als "Inhibitoren"	85
4.5.4.	Nucleotide als Substrate und "Inhibitoren"	87
4.5.5.	Produktinhibitionsmuster der Hinreaktion	98
4.6.	STEADY-STATE-UNTERSUCHUNGEN ZUR RÜCKREAKTION EINER 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE	109
4.6.1.	Vorversuche	109
4.6.2.	Anfangsgeschwindigkeitsmuster der Rückreaktion	109
4.6.3.	Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten	110
5.	DISKUSSION	114
5.1.	NAD-ABHÄNGIGE 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE IN HUMANPLACENTA UND IHRE ISOLIERUNG	114
5.2.	HYDROPHOBE WECHSELWIRKUNGEN DES ENZYMS	118
5.3.	MOLEKULARGEWICHT	123
5.4.	OPTIMIERUNG DER TESTBEDINGUNGEN FÜR ENZYMKINETISCHE STUDIEN	125
5.5.	SUBSTRAT- UND ENZYMLÖSUNGEN FÜR KINETIKEN	131
5.6.	REAKTIONSMECHANISMUS EINER NAD-ABHÄNGIGEN 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE	134
5.7.	SUBSTRATBINDUNGSSTELLEN DES ENZYMS	147
5.8.	MÖGLICHE BIOLOGISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE RELEVANZ VORGELEGTER KINETISCHER DATEN	154
6.	ZUSAMMENFASSUNG	161
7.	LITERATURVERZEICHNIS	164

ABKÜRZUNGEN

Abkürzungen enzymkinetischer Größen: 3.5.1.

A_{260}	Extinktion bei 260nm
Ac-NAD	3-Actylpyridin-adenin-dinucleotid, oxidiert
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cAMP	Adenosin-3':5'-monophosphat, zyklisch
cGMP	Guanosin-3':5'-monophosphat, zyklisch
DTE	Dithioerythrit
E_A	Aktivierungsenergie
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Gramm; Erdbeschleunigung
Gly/KOH	Glycerin/KOH-Puffer
GSH	Glutathion, reduziert
h	Stunde(n)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyäthyl)-1-piperazinyl]-äthansulfonsäure
15HPGDH	15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase
HHT	12-Hydroxy-5,8,10-heptadecatriensäure
ICI-...	Phenoxy-tetranor-$PGF_{2\alpha}$-Analoge
i.T.	im Testansatz
IU	internationale Enzymeinheit (vgl. 3.1.3.)
15K13,14DPG	15-Keto-13,14-dihydroprostaglandin(e)
KP	Kaliumphosphatpuffer
KPG	Ketoprostaglandin(e), Oxoprostaglandin(e), Dehydroprostaglandin(e)
M	molar = Mol/l
ME	2-Mercaptoäthanol
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
NAD	ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidiert
NADH	ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP	ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, oxidiert
NADPH	ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert

Oa.	Ordinatenabschnitt
p.A.	zur Analyse
PG	Prostaglandin(e)
PGI_2	Prostacyclin, PGX
R	Gaskonstante
Seph.	Sepharose
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-NAD	Thionicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidiert
St.	Steigung
T	absolute Temperatur (in Grad Kelvin)
TCA	Trichloressigsäure
Testbdgn.	Testbedingungen
TRAP	Triäthanolaminpuffer
TRIS/HCl	Trishydroxymethyl-Aminomethan-Puffer
TX	Thromboxan
U	Enzymeinheit (vgl.3.1.3.)
U-...	PG-Endoperoxid-Analoge (vgl. 2.3.1.)
v	Anfangsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse

1. EINLEITUNG

1935 nannte von Euler eine nicht näher identifizierte Substanzgruppe aus menschlicher Samenflüssigkeit mit interessanten pharmakologischen Aktivitäten Prostaglandin (PG). Später zeigte sich, daß PG in allen untersuchten Säugetiergeweben vorkommen und im Tierreich auch sonst weit verbreitet sind (von Euler & Eliasson,1967; van Dorp,1969; Caton, 1971; Losert,1975; Nomura & Ogata,1976). Sogar in Kaninchenblastozyten wurden sie gefunden (Dickman & Spilman, 1975). Die Konzentrationen einzelner primärer PG liegen in menschlicher Samenflüssigkeit mit 10^{-5} bis 10^{-4}M relativ hoch, während sie in anderen Säugetiergeweben und Körperflüssigkeiten mit 10^{-11} bis 10^{-7}M sehr niedrig angegeben werden (von Euler & Eliasson,1967; Caton,1971; Änggard, 1971; Dray & Charbonnel,1974). Dabei könnten durch rasche Biosynthese während der Aufarbeitung z.T. zu hohe Werte vorgetäuscht worden sein (Samuelsson et al.,1975). Die niedrigen endogenen PG-Konzentrationen waren mit ein Grund dafür, daß deren chemische Struktur erst in den sechziger Jahren aufgeklärt wurde (Samuelsson,1965; Bergström,1967). Es handelt sich um C_{20}-Carbonsäuren mit einem Fünfring zwischen C8 und C12 und einer C15-Hydroxylgruppe, die je nach der Struktur des Fünfrings als PG A, B, C, D, E oder Fα bezeichnet werden (vgl. Abb.1,2). Diese Symbole werden nach der Anzahl der Doppelbindungen in den Seitenketten mit einem Index versehen (Hamberg,1973; Nelson,1974; Horton,1976)[1].

Die Biosynthese der primären PG aus mehrfach ungesättigten, essentiellen Fettsäuren - im wesentlichen Arachidonsäure und Dihomo-γ-Linolensäure - wird durch PG-Synthetase katalysiert, einem mikrosomalen Multienzymkomplex, der eine entsprechend weite und in seiner Konzentration stark

---

[1] Die Bezeichnung der PG-Metabolite erfolgt hier in einer Form, die in der Literatur über PG am gebräuchlichsten ist: 15(S) anstatt 15(L) und 15-Keto-PG (15KPG) anstatt 15-Oxo- oder 15-Dehydro-PG (vgl. 2.3.1.).

differierende Spezies- und Gewebsverbreitung wie die PG selbst aufweist (van Dorp,1969; Christ,1970; Änggard,1971; Hinman,1972; Flower,1974; Bohman & Larsson,1975; Friedman et al.,1975; Pong & Levine,1977). In Abb.1 ist die PG-Biosynthese aus Arachidonsäure mit den bisher isolierten Zwischenprodukten und den wahrscheinlich beteiligten Enzymen und Cofaktoren dargestellt; die differierenden von verschiedenen Geweben synthetisierten $PGE_2/PGD_2/PGF_{2\alpha}$-Relationen hängen u.a. von deren Gehalt an Isomerasen und Cofaktoren ab (Nugteren & Hazelhof,1973; Hamberg & Samuelsson,1973; Wlodawer & Samuelsson,1973; Hamberg et al., 1974b; Miyamoto et al.,1974; Samuelsson et al.,1975; Chan et al.,1975; Blackwell et al.,1975; Raz et al.,1976; Hemler et al.,1976; Tai,1976; O'Brien & Rahimtula,1976; Hamberg & Fredholm,1976). Die durch Phenol, Hydrochinon, Tryptophan, L-Adrenalin, Dopamin etc. hervorgerufene "Stimulierung" der PG-Synthetase soll auf einem Schutz vor ihrer irreversiblen Selbstinaktivierung durch Radikale beruhen, die bei der Reduktion der 15-Hydroperoxygruppe auftreten können (Egan et al.,1976). Mit Ausnahme einer NADH-abhängigen PGE-9-Ketoreduktase aus Affenlebermikrosomen (Lee & Levine,1974a) wurden bisher nur cytoplasmatische Enzyme beschrieben, die PGE und PGF ineinander umwandeln (Hamberg & Israelsson,1970; Pace-Asciak & Domazet,1975; Pong & Levine,1977). Für das früher wenig beachtete PGD_2 wurde inzwischen eine quantitativ bedeutende Biosynthese für mehrere Gewebe beschrieben (Nugteren & Hazelhof,1973; Blackwell et al.,1975; Oelz et al.,1977; Abdel-Halim et al.,1977).

Nach dem heutigen Stand der Forschung entstehen die PGA in Vertebraten durch Dehydratisierung der PGE (Abb.2; Flower,1974; Horton,1976). PGE-Dehydraseaktivität wurde im Blutserum einiger Säugetiere gefunden, ist aber in menschlichem Serum äußerst gering (Polet & Levine,1975a). Ob die in einigen Säugetiergeweben gefundene PGA-Bildung enzymatisch ist oder auf einer nichtenzymatischen PGE-Dehydratisierung beruht, ist ebenso umstritten wie die PGA-Konzentration in Blutplasma und Geweben (Attallah et al,1974b;

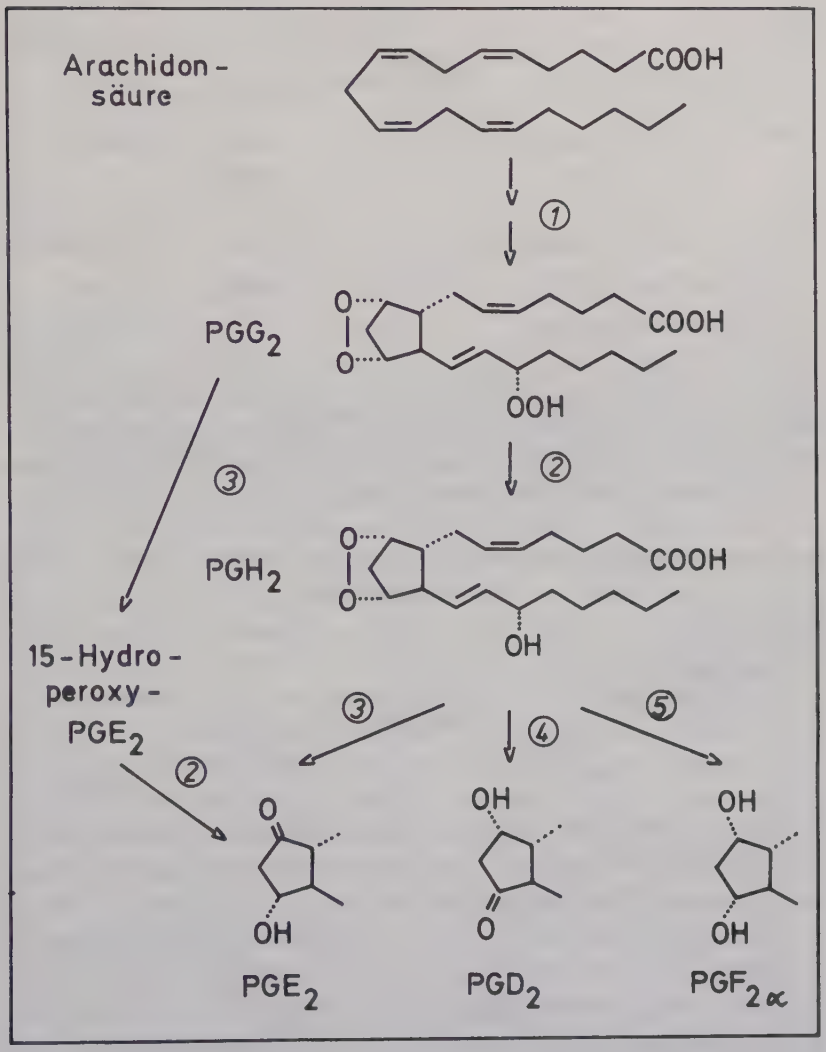

Abb.1 Die Biosynthese primärer PG aus Arachidonsäure. 1) Cyclodioxygenase (Fe,Häm); 2) Peroxidase (GSH,Hämin?); 3) Endoperoxid-Isomerase (GSH); 4) Endoperoxid-PGD-Isomerase (GSH;cytoplasmatisch), Serumalbumine; 5) Endoperoxid-Reduktase bisher nicht nachgewiesen; nichtenzymatische PGF-Bildung durch Reduktionsmittel (SnCl2,2-Mercaptoäthanol, Dithiole,CuII-Dithiole etc.). Welcher der beiden Wege von PGG zu PGE (D?) bevorzugt abläuft, ist noch nicht geklärt.

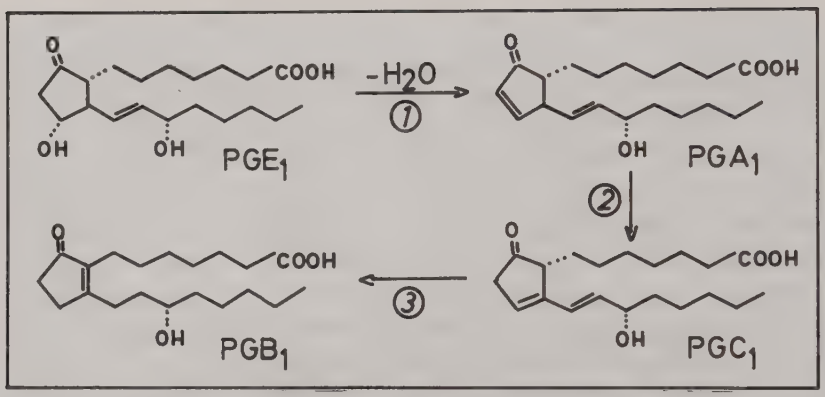

Abb.2 Die Bildung von PGA, C und B. 1) PGE-Dehydrase; 2) PGA-Isomerase; 3) PGC-Isomerase. Die Enzyme wurden bisher nur im Blutplasma verschiedener Säugetiere nachgewiesen. In schwach saurem (1) und schwach alkalischem (1-3) Milieu treten erhebliche Spontanraten auf.

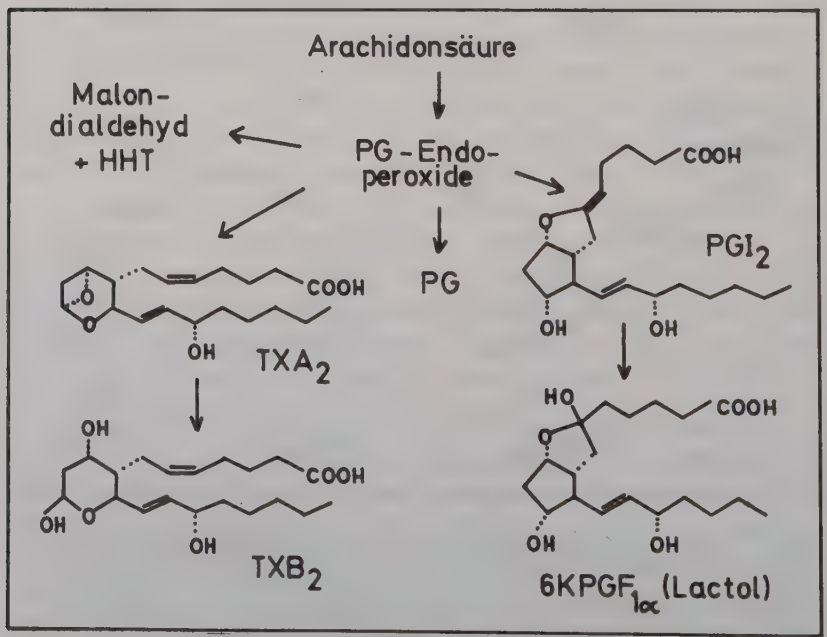

Abb.3 Alternative Umwandlung der PG-Endoperoxide. HHT = 12-Hydroxy-5,8,10-heptadecatriensäure, TX = Thromboxan, PGI2 = Prostacyclin, 6KPGF1α = 6-Keto-PGF1α. TXA2 und PGI2 werden nachweislich enzymatisch gebildet.

Losert,1975; Attallah & Schussler,1973; Cagen et al.,1976; Blackwell et al.,1975; Frölich et al.,1976; Flamenbaum & Kleinman,1977). PGA-Isomerase wurde aus Kaninchen- und Katzenserum angereichert, in menschlichem Blutserum aber nur in vernachlässigbar geringer Aktivität nachgewiesen (Abb.2; Jones & Cammock,1973; Polet & Levine,1975a,b). Demgegenüber weist kristallisiertes Humanserumalbumin eine relativ hohe PGC-Isomerase-Aktivität auf (Polet & Levine,1975a).

PG zeichnen sich durch eine hohe Wirkungsstärke - biologische Effekte sind in einigen Fällen schon in Konzentrationen um 10^{-11}M nachweisbar (Hinman,1972; Meyers & Swislocki,1974; Samuelsson et al.,1975; Losert,1975; Coceani et al.,1976; Horrobin,1977) - und ein äußerst breites pharmakologisches und physiologisches Wirkungsspektrum aus (von Euler & Eliasson,1967; Bergström et al.,1968; Caton, 1971; Pike,1971; Weeks,1972; Hinman,1972; Losert,1975; Horton,1976; Ramwell,1973,1974,1977). Die qualitative und quantitative Wirkung der natürlichen PG hängt hauptsächlich von der Struktur des Fünfringsystems ab (Losert,1975; Andersen et al.,1976). Z.B. sind PGD_2, $F_{2\alpha}$ und B Bronchokonstriktoren, während die PG E und A Bronchodilatoren sind,und PGD und $PGF_{2\alpha}$ wirken bei den meisten Säugetieren blutdrucksteigernd, während PG E, A und C den arteriellen Blutdruck senken. In beiden Fällen bestehen wie meist große Unterschiede in der Effektivität der PG-Gruppen, z.T. aber auch bezüglich der Existenz der $\Delta^{5,6}$-Doppelbindung. Qualitative Unterschiede zwischen PG_1 und PG_2 sind dagegen relativ selten (Weeks,1972; Jones & Cammock,1973; Losert, 1975; Hamberg et al.,1975a; Jones,1976; Mathé,1977; Samuelsson et al.,1975; Kadowitz & Hyman,1975).

Ein bestimmtes PG kann auf verschiedene Zellen, Gewebe und Organe unterschiedlich wirken, an gleichartigen Geweben in anderen Körperregionen entgegengesetzte Effekte erzielen, konzentrationsabhängige Qualitätsunterschiede aufweisen und in seiner Wirkung deutliche Speziesunterschiede zeigen; die PG-Wirkung kann vom "hormonellen Status" des Gewebes bzw. von der gemeinsamen Gabe mit Hormonen oder anderen

biologisch aktiven Substanzen beeinflußt werden und umgekehrt Hormonwirkungen beeinflussen (Bergström et al.,1968; Weeks,1972; Losert,1975; Bartmann,1975; Goldberg & Ramwell, 1975; Horrobin,1977; Samuelsson et al.,1975; Kenimer et al. 1977). Es ist deshalb nicht erstaunlich, daß eine Fülle widersprüchlicher, ja konträrer Ergebnisse über PG-Wirkungen vorliegen, besonders wenn man die Möglichkeit variierender endogener PG-Konzentrationen und glockenförmiger Dosis/ Wirkungskurven bedenkt (Horrobin,1977). Außerdem wird ein eventueller PG-Metabolismus und seine Beeinflussung viel zu selten in die Interpretation der Ergebnisse mit einbezogen (s.u.). Oft ist es schwer, physiologische und pharmakologische Effekte klar voneinander zu trennen.

An dieser Stelle ist es nicht möglich, ein einigermaßen vollständiges Bild der PG-Wirkungen zu geben, zumal die physiologische Rolle der PG in den einzelnen biologischen Systemen meist noch nicht ausreichend geklärt ist. Eine Beteiligung von PG wird z.B. diskutiert für die Regulation des Blutdrucks, der renalen Wasser- und Natriumausscheidung (Pike,1971; Lee,1972; Flamenbaum & Kleinman,1977), der Hormonsekretion in Hypothalamus/Hypophysenvorderlappen, Schilddrüse und Nebenniere (Honn & Chavin,1976a,b; Hedge, 1977; Kenimer et al.,1977), der Lipolyse im Fettgewebe (van Dorp,1969; Samuelsson et al.,1975; Losert,1975), der neuralen Erregungsübertragung an sympatischen Nervenendigungen (Losert,1975; Horton,1976), der Körpertemperatur (Horton,1976; Hawkins & Lipton,1977), der Magensaftsekretion (Robert,1977) und des Tonus der glatten Muskulatur (Pike,1971; Weeks,1972; Weber,1973; Mathé,1977).

Die Bedeutung der PG für eine große Anzahl von physiologischen Prozessen wird verständlich durch ihre enge Beziehung zu den "second messengers" cAMP, cGMP und Ca^{2+}. PGE hemmen die hormonstimulierte Steigerung des cAMP-Spiegels im Fettgewebe, während sie diesen in anderen Geweben meist erhöhen; dabei ist umstritten, inwieweit sie ein essentieller Bestandteil der Wirkungsübermittlung nichtsteroidaler Hormone sind (Hinman,1972; Kuehl et al.,1973; Weber,1973;

Gorman,1975; Samuelsson et al.,1975; Losert,1975; Kenimer et al.,1977). Die PGF scheinen eher mit dem cGMP-System in Wechselwirkung zu treten (Kuehl et al.,1973; Losert,1975; Samuelsson et al.,1975; Horton,1976). Es wird angenommen, daß PG in der glatten Muskulatur Ca^{2+}-Bewegungen oder Ca^{2+}-Wechselwirkungen mit den kontraktilen Elementen beeinflussen (Puglisi,1973; Kirton et al.,1973; Losert,1975; Manku & Horrobin,1976; Horrobin,1977). Hochspezifische, hochempfindliche PG-Rezeptoren wurden in Plasma- und Zellmembranen einer Reihe von Geweben nachgewiesen, die teilweise Ca^{2+} für ihre Aktivität benötigen (Samuelsson et al., 1975; Powell et al.,1975,1976; Rao,1975a,b; Frölich et al., 1976).

Die Hemmung der Cyclodioxygenase durch nichtsteroidale Entzündungshemmstoffe wie z.B. Aspirin und Indomethacin und der Arachidonsäurefreisetzung aus den Phospholipiden der Zelle durch entzündungshemmende Corticosteroide deuten auf eine Rolle der PG bei entzündlichen Prozessen hin (Vane, 1971; Hinman,1972; Flower,1974; Losert,1975; Hong & Levine, 1976). Ursächlich für die Symptome akuter Entzündungen, wie auch anderer früher den primären PG zugeschriebener Effekte, könnte allerdings das Intermediärprodukt der PG-Biosynthese, das Endoperoxid PGG_2, oder ein Teil seiner alternativen Umwandlungsprodukte (z.B. Malondialdehyd, 15-Hydroperoxy-PGE_2, Thromboxan A_2 (TXA_2) oder freie Radikale) sein (Flower et al.,1973; Kuehl et al.,1977; Kolata,1975). Die verschiedenen Wege des PG-Endoperoxid-Metabolismus sind in Abb.3 dargestellt; die chemisch instabilen TXA_2, Prostacyclin (PGI_2), PGG_2 und PGH_2 haben in wäßrigem Medium bei neutralem pH und 37°C Halbwertszeiten zwischen 0.5 und 5min (Hamberg et al.,1974a,b,1975b; Bunting et al., 1976; Johnson et al.,1976; Moncada et al.,1976; Needleman et al.,1976). Eine im Vergleich zu den primären PG höhere Hydroxyheptadecatriensäure (HHT)-, TXA_2- und PGI_2-Synthese wurde in einigen Geweben direkt oder indirekt nachgewiesen (Hamberg et al.,1974a; Hamberg & Samuelsson,1974; Wolfe et al.,1976; Bunting et al.,1976; Moncada et al.,1977; de

Deckere et al.,1977). HHT, TXB_2 und $6KPGF_{1\alpha}$ scheinen keine oder nur relativ geringe biologische Aktivität aufzuweisen (Miller et al.,1977; Omini et al.,1977; Tateson et al., 1977; Boot et al.,1977). Dagegen zeigen TXA_2, PGG_2 und PGH_2 eine sehr hohe Aktivität bei der Thrombozytenaggregation und kontrahieren die glatte Muskulatur einiger Gewebe effektiver als PG (Hamberg et al.,1974b,1975a; Gorman,1975; Tuvemo et al.,1976; Needleman et al.,1976; Svensson et al., 1977; Miller et al.,1977). PGI_2, das in Gefäßwänden wahrscheinlich aus Thrombozyten-PGH_2 gebildet wird, relaxiert die Muskulatur bestimmter Gefäße, hemmt durch Erhöhung des cAMP-Spiegels die Thrombozytenaggregation stärker als PGD_2 und PGE_1 und soll an der Vermeidung von Thrombosen beteiligt sein (Bunting et al.,1976; Moncada et al.,1976,1977; Gorman et al.,1977; Tateson et al.,1977). Auf der anderen Seite gibt es durchaus Gewebe, in denen PGE_2, D_2 oder $F_{2\alpha}$ Hauptmetabolite von PGG_2 sind und biologische Aktivitäten, in denen sie die oben genannten Substanzen übertreffen (Kolata,1975; Samuelsson et al.,1975; Gorman,1975; Wlodawer et al.,1976; Fredholm & Hamberg,1976; Ojeda et al., 1976; Needleman et al.,1976; Moncada et al.,1976; Coceani et al.,1976; Svensson et al.,1977; Omini et al.,1977; Seyberth et al.,1977). PGE_2 ist ein wesentlich effektiverer Stimulator der hypophysären Gonadotropinfreisetzung, der Körpertemperaturerhöhung und der Knochenresorption als chemisch stabile PGH_2-Analoge mit den Endoperoxiden vergleichbarer Geometrie und Aktivität (Ojeda et al.,1976; Hawkins & Lipton,1977; Tashjian et al.,1977a).

Die zuletzt genannten Effekte führten auch dazu, daß PGE_2 (oder sein 13,14-Dihydro-Metabolit) als Mediator der mit einigen tierexperimentellen (und menschlichen) Tumoren verbundenen Hyperkalzämie vorgeschlagen und inzwischen bestätigt wurde. Eine Reihe von Tumoren und Tumorzellkulturen zeigen erhöhte PG-Spiegel und/oder PG-Freisetzung. PG bzw. PG-Biosynthese-Inhibitoren sind in der Lage, die Replikationsrate in Tumorzellkulturen und die Größe einiger Tumoren zu beeinflussen. Es ist allerdings noch nicht geklärt,

welche Rolle den PG in der Onkologie zukommt (Jaffe,1974; Tashjian et al.,1974,1977a,b; Seyberth et al.,1977; Hong et al.,1977; Jaffe & Santoro,1977). Eine pathophysiologische Rolle könnten PG auch bei einigen anderen Erkrankungen, wie z.B. Dünndarm- und Magengeschwüren, Diarrhoe, einigen Formen der essentiellen Hypertonie und der Infertilität, Dysmenorrhoe, vorzeitiger Wehentätigkeit und offenem Ductus arteriosus Botalli, spielen. PG, chemisch modifizierte PG mit eingeschränktem Wirkungsspektrum und verlangsamter Elimination, PG-Antagonisten und Hemmstoffe der PG-Biosynthese könnten in Zukunft u.a. in diesen Bereichen therapeutische Bedeutung erlangen (Losert,1975; Bartmann, 1975; Robert,1977; Armstrong et al.,1976; Pace-Asciak,1976; Leary et al.,1977; Labhsetwar,1974; Goldberg & Ramwell, 1975; Coceani et al.,1976; Clyman et al.,1977).

$PGF_{2\alpha}$, PGE_2 oder einige Analoge gelten trotz Nebenwirkungen heute bereits als Mittel der Wahl für einen Schwangerschaftsabbruch im zweiten Trimester. Im ersten Trimester können sie zur Zervixerweichung und Erweiterung des Zervikalkanals vor der Saugkürrettage angewendet werden. Zur Weheneinleitung bei der Geburt sind $PGF_{2\alpha}$ und PGE_2 dem Oxytocin in etwa gleichwertig, scheinen jedoch bei verhaltener Fehlgeburt, Blasenmole und Anenzephalie von Vorteil zu sein (Anderson,1973; Anderson & Speroff,1973; Brenner et al.,1973; Labhsetwar,1974; Goldberg & Ramwell,1975; Zahn & Johannigmann,1975; Kepp,1976; Barden,1977). Die physiologische Rolle der PG im Menstruationszyklus, während der Schwangerschaft und Geburt ist noch nicht ausreichend geklärt. PGE_2 und in geringerem Maße $PGF_{2\alpha}$ führen bei Schwangeren zu Kontraktionen der Uterusmuskulatur. $PGF_{2\alpha}$ gilt bei einer Reihe von Säugetieren als luteolytisches "Hormon" (Weeks et al.,1973; Pharris & Behrman,1973; Labhsetwar, 1974; Goldberg & Ramwell,1975; Barden,1977). Während der Wehentätigkeit wurden beim Menschen stark erhöhte Spiegel der Hauptmetaboliten von $PGF_{2\alpha}$ in mütterlichem Urin und periphärem Blutplasma und von $PGF_{2\alpha}$ und PGE_2 in der Amnionflüssigkeit festgestellt (Hamberg,1974; Granström & Kin-

dahl,1976; Gréen et al.,1974; Salomon & Amy,1973; Keirse & Turnbull,1973; Keirse et al.,1974; Dray & Frydman,1976).

PG werden nicht in besonderen Zellen oder Zellkompartimenten gespeichert sondern bei Bedarf synthetisiert und wirken meist am Ort ihrer Biosynthese (Änggard,1971; Änggard et al.,1972; Losert,1975; Horton,1976). Sie gelten als lokale Modulatoren hormonaler und nervaler Effekte. Dies setzt eine rasche Inaktivierung dieser hochaktiven Substanzen an Ort und Stelle voraus, um eine überschießende Reaktion in der Zelle und ein Übergreifen der Wirkung auf andere Zellen, Gewebe oder Organe zu vermeiden. Sinnvoll erscheint auch ein Sekundärfilter, der eventuell in den Kreislauf gelangte PG eliminieren kann (Losert,1975). Eine einmalige Passage des Lungenkreislaufs reicht aus, die PGE fast vollständig und die PGF nur wenig langsamer zu inaktivieren (Ferreira & Vane,1967; Piper et al.,1970; Hook & Gillis,1975; Ryan et al.,1975). Dies entspricht einer biologischen Halbwertszeit von weniger als 1min (Losert,1975; Samuelsson et al.,1975). Im Ausmaß der PGA-Inaktivierung bei der Lungenperfusion könnten Speziesunterschiede bestehen (Horton & Jones,1969; Piper et al.,1970; Gross & Gillis,1976). Attallah et al. (1974a) konnten jedoch zeigen, daß PGA_2 bei einer einzigen Passage der Kaninchenniere fast vollständig metabolisiert wird. Auch reife Humanplacenta als "Filter" zwischen foetalem und mütterlichem Kreislauf zeigt eine hohe PG-Metabolismus-Kapazität (Jarabak,1972; Keirse & Turnbull,1975).

Der erste Schritt des Hauptabbauweges der PGE, F und A beim Menschen wird durch 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase (15HPGDH) katalysiert, gefolgt von der Dehydrierung der 15-Keto-PG (15KPG) durch 15KPG-$\Delta^{13,14}$-Reduktase (Abb. 4; Änggard,1971; Granström & Samuelsson,1971; Hamberg & Samuelsson,1971; Attallah et al.,1975). Die cytoplasmatischen Enzyme verwenden entweder NAD(H) oder NADP(H) als Cofaktor. Bei NADP-abhängiger 15HPGDH handelt es sich wahrscheinlich um eine Nebenaktivität cytoplasmatischer NADPH-abhängiger PGE-9-Keto-Reduktase, die, ebenso wie entspre-

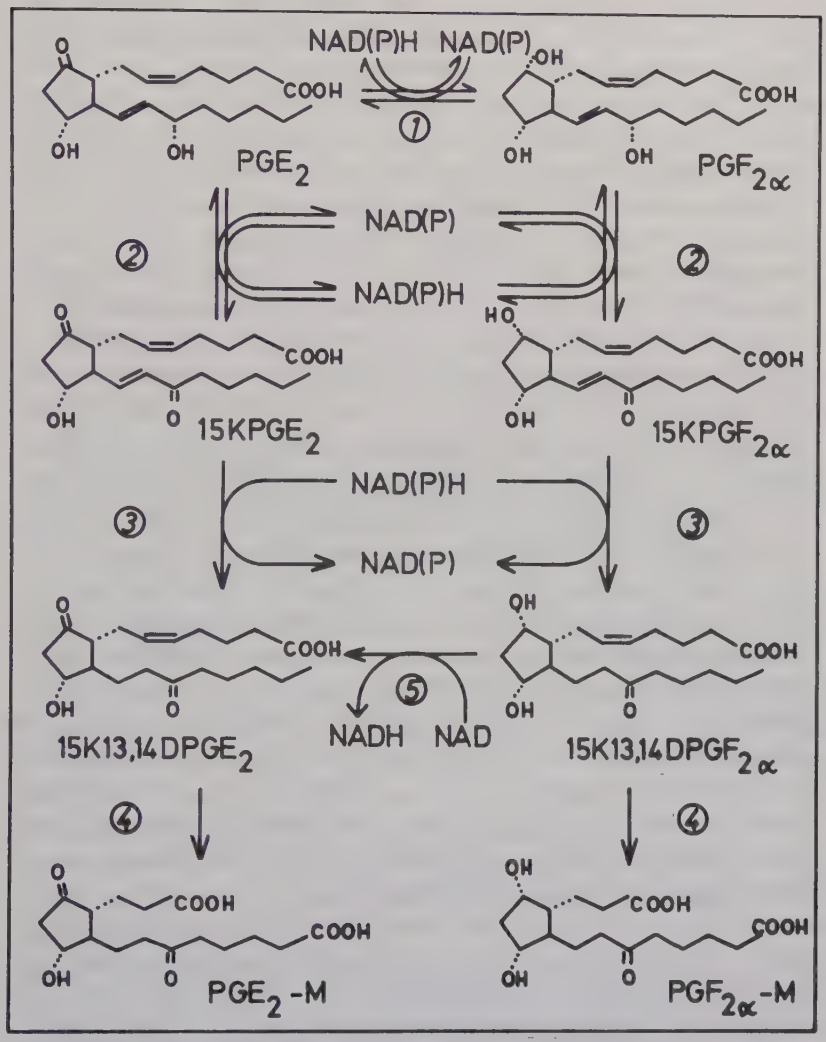

Abb.4 Die wichtigsten nachgewiesenen Wege des PGE- und PGF-Metabolismus. 1) PGE-9-Keto-Reduktase; 2) 15HPGDH; 3) 15KPG-Δ13,14-Reduktase; 4) ß- und ω-Oxidation; 5) PG-9-Hydroxy-Dehydrogenase. 1) und 5) sind wahrscheinlich identisch (vgl. Lee et al.,1975; Pace-Asciak & Domazet,1975). 15KPGE und 15K13,14DPGE sind ebenfalls Substrate einer NADPH-abhängigen PGE-9-Keto-Reduktase (Limas,1977). PGE2-M bzw. PGF2α-M sind die entsprechenden Hauptmetabolite im Urin (Hamberg & Samuelsson,1971; Granström & Samuelsson, 1971). 15K13,14DPG = 15-Keto-13,14-dihydro-PG.

chende cytoplasmatische und mikrosomale NADH-abhängige Enzyme, PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ ineinander umzuwandeln vermag (Abb.4; Änggard & Samuelsson,1966; Lee & Levine,1974a,b,1975; Lee et al.,1975; Kaplan et al.,1975; Westbrook & Jarabak,1975; Hensby,1975; Hassid & Levine,1977; Pong & Levine,1977). Bemerkenswert erscheint, daß NADP-abhängige 15HPGDH/NADPH-abhängige PGE-9-Keto-Reduktase eine wesentlich höhere scheinbare Michaeliskonstante für PGE_2 aufweist als NAD-abhängige 15HPGDH (Stone & Hart,1975; Hansen,1976; Pong & Levine,1977). "In vitro" sind einige Säugetiergewebe in der Lage 15K13,14DPG zu den entsprechenden 13,14-Dihydro-PG zu hydrieren (Änggard,1971; Änggard & Larsson,1971; Bygdeman et al.,1974; Attallah et al.,1975; Samuelsson et al.,1975). Die 15K13,14DPG, die Hauptmetaboliten im Blut, werden u.a. in der Leber der ß- und ω-Oxidation unterworfen (Marrazzi & Andersen,1974; Samuelsson et al.,1975).

NAD-abhängige 15HPGDH (11α,15-Dihydroxy-9-oxoprost-13-enoat: NAD-Oxidoreduktase, EC 1.1.1.141) wurde in fast allen untersuchten Säugetiergeweben, allerdings mit erheblichen regionalen Aktivitätsunterschieden, gefunden (Änggard,1971; Änggard et al.,1971; Marrazzi & Andersen,1974; Losert,1975; Sun et al.,1976; Hansen,1976). Das Enzym katalysiert nicht nur den ersten Schritt des Hauptabbauweges der PGE, F und A sondern ist auch für diese und eine Reihe ihrer Analogen spezifisch, wobei die 15(S)-Hydroxylgruppe der natürlichen PG Voraussetzung für die Substrataktivität ist (Änggard & Samuelsson,1966; Nakano et al.,1969; Shio et al.,1970; Jarabak,1972; Marrazzi & Andersen,1974; Sun et al.,1976). Mit der Einwirkung des Enzyms geht normalerweise eine deutliche Verminderung der biologischen Aktivität einher. Je nach Testsystem liegt diese bei den 15KPG zwischen null und einem Fünftel der entsprechenden PG-Aktivität, wenn man von der Steigerung des arteriellen Blutdrucks von Schafen durch $15KPGF_{2\alpha}$ und möglicherweise von Tracheapräparationen als Testsystem absieht (Änggard,1966; Kloeze,1969; Bygdeman et al.,1974; Attallah et al.,1975; Gross & Gillis,1976; Kirton et al.,1976; Coceani et al.,

1976; Yankee et al.,1976; Jones,1976; vgl. besonders Crutchley & Piper,1975; Wasserman,1975; Dawson et al.,1974; Boot et al.,1976,1977). 15KPGE$_1$, 15KPGE$_2$ und 15KPGF$_{2\alpha}$ zeigen gegenüber PG-Rezeptoren eine um mindestens zwei Zehnerpotenzen geringere Affinität als die entsprechenden PG (Powell et al.,1975 ; Frölich et al.,1976; Kirton et al., 1976). Spätestens die nach dem 15HPGDH-Angriff durch 15KPG-$\Delta^{13,14}$-Reduktase katalysierte 15K13,14DPG-Bildung führt zu einer fast vollständigen biologischen Inaktivierung (Änggard,1966; Bygdeman et al.,1974; Crutchley & Piper,1975; Jones,1976; Frölich et al.,1976). Diese Ausführungen zeigen die zentrale Stellung NAD-abhängiger 15HPGDH im PG-Metabolismus.

Bemerkenswert erscheint, daß einige Formen der Hypertonie bei Ratten mit einem 15HPGDH-Mangel in Niere und Lunge verbunden sind (Armstrong et al.,1976; Pace-Asciak,1976; Leary et al.,1977) und VX$_2$-Karzinome von Kaninchen keine cytoplasmatische 15HPGDH enthalten (Seyberth et al.,1977). Die 15HPGDH-Aktivität wird "in vitro" durch allerdings meist relativ hohe Konzentrationen von Schilddrüsen- und Steroidhormonen und verschiedener Medikamente beeinflußt (Tai et al.,1974; Lee & Levine,1975; Schlegel et al.,1974; Thaler-Dao et al.,1974; Hansen,1976). Altersabhängige Veränderungen der 15HPGDH-Aktivität wurden in mehreren Geweben beobachtet (Schlegel et al.,1974; Sun & Armour,1974; Pace-Asciak,1975; Hansen,1976). Die physiologische Bedeutung der 15HPGDH in den einzelnen Geweben ist bisher nur unzureichend geklärt.

Neben ihrer Funktion bei der Kontrolle des PG-Spiegels in der Zelle und der Verhinderung des Übergreifens der PG-Wirkung auf andere Gewebe hat 15HPGDH eine bisher zu selten beachtete Bedeutung für die Interpretation pharmakologischer Untersuchungen mit PG, PG-Metaboliten und PG-Analogen. Hochgereinigte, ausreichend stabilisierte 15HPGDH-Präparationen können als analytisches Werkzeug eingesetzt werden zur Identifizierung und Bestimmung von PG und zur Untersuchung (Charakterisierung) von PG-Analogen

und Inhibitoren des PG-Metabolismus (Änggard,1971; Matschinsky et al.,1974; Marrazzi & Andersen,1974; Bartmann, 1975). Aus den strukturellen Erfordernissen der Substratbindungsstellen können Informationen für die chemische Synthese von biochemisch stabileren PG-Analogen erhalten werden (Bartmann,1975; Andersen et al.,1976). Für diese Zwekke und die Beurteilung der biologischen Bedeutung NAD-abhängiger 15HPGDH ist die Kenntnis ihrer Eigenschaften, ihrer kinetischen Parameter und ihres Reaktionsmechanismus von großem Wert. Vor enzymkinetischen Untersuchungen sollte allerdings eine ausreichende Reinigung des Enzyms und Optimierung des Testsystems erfolgen.

Die bekannten Eigenschaften NAD-abhängiger 15HPGDH und die Anreicherungen des Enzyms aus verschiedenen Geweben wurden von Marrazzi & Andersen (1974) und Hansen (1976) zusammenfassend dargestellt. Auf sie wird hier im Rahmen der Diskussion näher eingegangen. Folgende Gründe führten zur Wahl von Humanplacenta als Ausgangsmaterial der Isolierung NAD-abhängiger 15HPGDH:

1) Reife Humanplacenta ist relativ leicht verfügbar. Sie bietet die Chance einer Enzymisolierung aus menschlichem Gewebe, das sonst nur schwer zugänglich ist.

2) Die 15HPGDH-Konzentrationen der Gewebe sind im Vergleich zu denen vieler anderer Enzyme sehr gering. Reife Humanplacenta gehört zu den Geweben mit höchster spezifischer Aktivität für NAD-abhängige 15HPGDH (Jarabak,1972).

3) Humanplacenta befindet sich während der Schwangerschaft und Geburt im Zentrum des weiblichen reproduktiven Systems, wo den PG eine physiologische Rolle zugesprochen wird und wo sie die oben beschriebene pharmakologische Bedeutung besitzen. Die Placenta ermöglicht den Stoffaustausch zwischen foetalem und maternalem Kreislauf und dient gleichzeitig als Barriere für eine Vielzahl von Substanzen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, NAD-abhängige 15HPGDH aus Humanplacenta möglichst rein zu isolieren und sie unter besonderer Berücksichtigung enzymkinetischer Untersuchungen zu charakterisieren. Eine weitgehende Aufklärung des Mechanismus der 15HPGDH-Reaktion wurde angestrebt.

Dazu sollte die Anreicherung des Enzyms aufbauend auf bereits bestehenden Isolierungen (Jarabak,1972; Schlegel et al.,1974; Rückrich,1974), insbesondere durch Einführung bisher nicht verwendeter Trennmethoden, verbessert und die Eignung der erhaltenen Enzymlösungen für kinetische Studien bezüglich Stabilität, elektrophoretischer Reinheit, enzymatischer Fremdaktivitäten und einer eventuellen Änderung der Eigenschaften des Enzyms im Lauf der Isolierung überprüft werden. Zur Optimierung des Testsystems war die Untersuchung des Einflusses von Salzen, Puffern, pH und Temperatur auf die 15HPGDH-Aktivität geplant. Ferner sollten Effekte von PG-Analogen mit möglicher therapeutischer Relevanz sowie anderer physiologisch oder pharmakologisch interessanter Substanzen gemessen werden.

Da die bis dahin mit NAD-abhängiger 15HPGDH verschiedener Quellen und Anreicherungen unter Vernachlässigung des Cosubstrateffekts bestimmten scheinbaren Michaeliskonstanten und relativen Maximalgeschwindigkeiten für PG z.T. stark voneinander abwichen (Marrazzi & Andersen,1974; Rückrich et al.,1975) erschien es sinnvoll, zunächst vollständige Anfangsgeschwindigkeitsmuster der Hinreaktion für NAD und verschiedene PG bzw. PG-Analoge zu erstellen und die extrapolierten kinetischen Konstanten zu bestimmen. Die sich daraus ergebenden mechanistischen Vorstellungen sollten durch ein Anfangsgeschwindigkeitsmuster der Rückreaktion, das vollständige Produktinhibitionsmuster der Hinreaktion und Messungen mit Substrat- und Produktanalogen vertieft werden.

2. MATERIAL

2.1. GERÄTE

Unicam SP 1800 UV-Spektralphotometer und Unicam AR 25 Linear Recorder (PYE UNICAM LTD, Cambridge, England); Spektralphotometer PMQ II (ZEISS, Oberkochen); Durchlaufphotometer Uvicord 4701 A und Recorder LKB 6520 A (LKB-PRODUKTOR AB, Stockholm, Schweden); Fraktionssammler Linear II (SERVA, Heidelberg); Ultra-Thermostat (COLORA MESSTECHNIK, Lorch); Thermostat (BRAUN, Melsungen); Flachgel-Disk-Elektrophorese-Apparatur 146200 (DESAGA, Heidelberg); Leitfähigkeitsmeßgerät LF 39 (WISS. TECHN. WERKST., Weilheim); pH-Meter PHM28c (RADIOMETER, Kopenhagen); pH-Meter pH71 (KNICK, Berlin); pH-Einstabmeßketten N 61 und N 68 (SCHOTT, Mainz); Stock-Zentrifuge (STOCK, Marburg/Lahn); Christ-Zentrifuge, Rotoren 8510 und 8680 (HERAEUS-CHRIST, Osterode/Harz); Kühlzentrifuge J-21B, Rotor JA-14 und Präparative Ultrazentrifuge Spinco L2 65B, Rotoren SW 27 und 60TI (BECKMAN, München); Pumpe Minipuls II (GILSON, Villiers-Le-Bel, Frankreich); Waagen ME 22 (BA 25, BE 22), M 5, B 5, P 1200 (METTLER, Zürich, Schweiz); Starmix (ELEKTROSTAR, Eislingen); Potter-Elvehjem-Homogenisator und Dounce-Glashomogenisator (BRAUN, Melsungen); Vortex-Genie (SCIENTIFIC INDUSTRIES INC., Springfield, U.S.A.); Rotationsverdampfer WB (BÜCHI, Schweiz).

2.2. CHROMATOGRAPHIE- UND FILTRIERMATERIAL

Sephadex G-25 coarse, Sephadex G-50 coarse, Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-50, Octyl-Sepharose CL-4B, Phenyl-Sepharose CL-4B (PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala, Schweden); DEAE-Zellulose DE 23, Glasfaserfilter GF/C (WHATMAN, Maidstone, England); Agarose-Hexan-Nicotinamid Adenin Dinucleotid AGNAD^{TM} Type 3 von P-L BIOCHEMICALS (SERVA INTERNATIONAL, Heidelberg); ß-Nicotinamid Adenin Dinucleotid-Agarose (SIGMA, München); DC-Karten SI (RIEDEL DE HÄEN, Seelze/Hannover); Polygram SIL G/UV$_{254}$, Nano-Platten SIL 20 (MACHERY, NAGEL & Co., Düren); Visking-Dialyseschlauch

(UNION CARBIDE CORPORATION, Chicago, U.S.A.); Celluloseacetatstreifen (SARTORIUS MEMBRAN-FILTER, Göttingen); Selectron-Filter BA 90 (SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel).

2.3. CHEMIKALIEN

2.3.1. Prostaglandine und Analoge

Folgende Prostaglandine (PG) und Analoge wurden freundlicherweise von Dr. U.F. Axen (THE UPHOHN COMPANY, Kalamazoo, U.S.A.) bzw. Dr. Brunnberg und Dr. Kordian (UPJOHN GmbH, Heppenheim) zur Verfügung gestellt:
11α,15S-Dihydroxy-9-oxoprost-13E-ensäure (PGE_1),
11α,15S-Dihydroxy-9-oxoprosta-5Z,13E-diensäure (PGE_2),
9α,11α,15S-Trihydroxyprost-13E-ensäure ($PGF_{1\alpha}$),
9α,11α,15S-Trihydroxyprosta-5Z,13E-diensäure ($PGF_{2\alpha}$),
15S-Hydroxy-9-oxoprosta-10,13E-diensäure (PGA_1),
15S-Hydroxy-9-oxoprosta-8(12),13E-diensäure (PGB_1),
9α,15S-Dihydroxy-11-oxoprosta-5Z,13E-diensäure (PGD_2),
11α-Hydroxy-9,15-dioxoprost-13E-ensäure ($15KPGE_1$),
11α-Hydroxy-9,15-dioxoprosta-5Z,13E-diensäure ($15KPGE_2$),
9α,11α-Dihydroxy-15-oxoprosta-5Z,13E-diensäure ($15KPGF_{2\alpha}$),
11α-Hydroxy-9,15-dioxoprostansäure ($15K13,14DPGE_1$),
9α,11α-Dihydroxy-15-oxoprost-5Z-ensäure ($15K13,14DPGF_{2\alpha}$),
11α,15S-Dihydroxy-15-methyl-9-oxoprosta-5Z,13E-diensäure (15-Methyl-PGE_2),
9α,11α,15S-Trihydroxy-15-methylprosta-5Z,13E-diensäure (15-Methyl-$PGF_{2\alpha}$),
Hemiacetal von 8-(1-Hydroxy-3-oxopropyl)-9α,12S-dihydroxy-5Z,10E-heptadecadiensäure (Thromboxan B_2, TXB_2).

Die PG-Endoperoxidanalogen 15S-Hydroxy-9α,11α-(epoxymethano)prosta-5Z,13E-diensäure (U-44069) und 15S-Hydroxy-11α,9α-(epoxymethano)prosta-5Z,13E-diensäure (U-46619) waren ein Geschenk von Dr. G.L.Bundy (THE UPJOHN COMPANY, Kalamazoo, U.S.A.).

Folgende PG-Analoge wurden mir freundlicherweise von Dr. N.S. Crossley (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES, Macclesfield, England) überlassen:

16-(4-Fluorophenoxy)-17,18,19,20-tetranor-$PGF_{2\alpha}$(ICI,87,907) 16-(4-Fluorophenoxy)-17,18,19,20-tetranor-ent-$PGF_{2\alpha}$ (ICI 87,904) und beider Racemat (ICI 79,939) sowie 16-(3-Trifluoromethylphenoxy)-17,18,19,20-tetranor-$PGF_{2\alpha}$ (ICI 86, 384), 16-(3-Trifluoromethylphenoxy)-17,18,19,20-tetranor-ent-$PGF_{2\alpha}$ (ICI 86,768) und beider Racemat (ICI 81,008).

2.3.2. Nucleotide

ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidierte Form, Reinheitsgrad I (NAD); ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduzierte Form, Reinheitsgrad I (NADH); ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduzierte Form, Tetranatriumsalz, Reinheitsgrad I (NADPH); Adenosin-5'-monophosphorsäure (AMP) (BOEHRINGER, Mannheim).
ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidierte Form, Grade V (NAD); ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduzierte Form, Dinatriumsalz, Grade III (NADH); ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, oxidierte Form, Natriumsalz, Sigma Grade (NADP); Thionicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidierte Form (S-NAD); Adenosin-3':5'-monophosphat, zyklisch, Natriumsalz (cAMP); Guanosin-3':5'-monophosphat, zyklisch, Natriumsalz (cGMP) (SIGMA, München).
3-Acetylpyridin-adenin-dinucleotid, reinst (Ac-NAD) (SERVA, Heidelberg).

2.3.3. Proteine

Rinderserumalbumin, rein; Ovalbumin, reinst (SERVA, Heidelberg); Rinderserumalbumin, 1 x krist., Myoglobin, Type II (SIGMA, München); Alkalische Phosphatase aus E.coli; Cytochrom c aus Pferdeherz (BOEHRINGER, Mannheim).

2.3.4. Sonstige Chemikalien

Triäthanolamin·HCl, p.A., schwermetallfrei; 2-Mercaptoäthanol (ME), reinst; Amidoschwarz 10B extra, reinst; Coomassie brillant blau G-250, rein; p-Nitro-blautetrazoliumchlorid, p.A.; Phenazin methosulfat, rein; Triton X-100, p.A.; BRIJ 56, pract.; BRIJ 58, pract.; Dodecylsulfat,

Natriumsalz, reinst (SDS); Gangliosidgemisch aus Rinderhirn, rein; L-α-Lecithin (dipalmitoyl), reinst; 17ß-Östradiol, reinst; cis-Androsteron, pharm.; L-Adrenalin, pharm.; DL-4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure, p.A.; Homovanillinsäure, reinst (SERVA, Heidelberg). Methergin^{R}; Syntocinon^{R} (SANDOZ, Nürnberg). Sucrose, special enzyme grade (SCHWARZ/MANN, Orangeburg). Dithioerythrit (DTE); 4-α-Phorbol; 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (SIGMA, München). Phosphormolybdänsäure, p.A. (RIEDEL DE HÄEN, Seelze/Hannover). 2-[4-(2-Hydroxyäthyl)-1-piperazinyl]-äthansulfonsäure, A grade (HEPES) (CALBIOCHEM, Los Angeles, U.S.A.). Trichloressigsäure, D.A.B.7 (HOECHST, Frankfurt).
Carbenoxalon ("3-Hydroxy-11-oxoolean-12-en-30-oic acid hydrogen succinate") wurde freundlicherweise überlassen von Dr. B.A. Peskar.
Reagenzien zur Disk-Elektrophorese (SERVA, Heidelberg; BIO·RAD, Richmond, U.S.A.).
Glycerin, p.A., doppelt destilliert; Anisaldehyd; Essigsäureäthylester (Essigester), D.A.B.6; Eichpuffer; alle anderen Chemikalien waren von p.A.-Qualität (MERCK, Darmstadt).
Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungen mit aqua bidest. (doppelt destilliertem Wasser) angesetzt.

2.4. HUMANPLACENTEN

Die verwendeten reifen Humanplacenten wurden durch Vermittlung von Prof. Dr. A.E. Schindler von der Frauenklinik der Universität Tübingen erhalten. Sie stammten von komplikationslosen, termingerechten Spontangeburten, waren vollständig und hatten normales Aussehen und Gewicht. Sofort nach erfolgter Inspektion wurden die Placenten in eiskalten Puffer A überführt, und spätestens 30min post partum wurde mit der Perfusion begonnen.

3. METHODEN

3.1. AKTIVITÄTSTEST FÜR NAD-ABHÄNGIGE 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE UND ENZYMEINHEITEN

Als enzymatischer Aktivitätstest für die NAD-abhängige 15HPGDH wurde im wesentlichen die von Jung et al. (1975) modifizierte Methode B von Änggard & Samuelsson (1966) verwendet. Dabei wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Hinreaktion ausgenutzt: $NAD^+ + PG \longrightarrow NADH + H^+ + 15KPG$. Die NADH-Bildung wurde in einer MT4/QS-Küvette (Volumen des Ansatzes: 1ml) mit Hilfe eines Unicam SP 1800 Doppelstrahlphotometers mit Schreiber (Unicam AR 25 Linear Recorder) und thermostatisiertem Küvettenhalter bei 340nm verfolgt. In der Referenzküvette befand sich ein bis auf PG vollständiger Testansatz, der auch das Lösungsmittel für die PG enthielt. Nach einer 5min dauernden Vorinkubation bei Reaktionstemperatur des das Enzym und alle sonstigen Zusätze enthaltenden Reaktionsgemisches wurde mit PG gestartet. Der pH wurde direkt im Ansatz bei Reaktionstemperatur bestimmt und die Temperatur in einer Vergleichsküvette im selben Küvettenhalter gemessen.

Die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion wurde aus der Steigung des linearen Bereichs der Schreiberkurve ermittelt. Dabei wurde ein Extinktionskoeffizient von $6.22 cm^2/\mu Mol$ zugrunde gelegt (Bergmeyer,1970).

Die NAD- und Pufferlösungen wurden mit aqua bidest. hergestellt, in passenden Volumen bei -20^oC aufbewahrt, bei Bedarf aufgetaut und nur am gleichen Tag verwendet. PGE_2 wurde in kleinen Proben eingewogen, bei -20^oC aufbewahrt und frisch in 50mM Kaliumphosphatpuffer (KP), pH 6.9, gelöst.

3.1.1. Standardtest

Der Standardtest wurde bei $(37 \pm 0.2)^oC$ und pH 7.4 im Testansatz (i.T.) in Triäthanolaminpuffer (TRAP) nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

Lösungen	Volumen i.T. (µl)	Konzentration i.T. (mM)
0.2M TRAP, pH 7.7 (23°C)	500	100
10mM NAD	200	2
Probelösung	n	
aqua bidest.	250 - n	
5min Vorinkubation bei (37 ± 0.2)°C		
2mM PGE_2	50	0.1

3.1.2. Test für internationale Einheiten

Dieser Aktivitätstest wurde bei (25 ± 0.2)°C im pH-Optimum von 9.8 bei annähernd sättigenden Substratkonzentrationen in Glycerin/KOH-Puffer (Gly/KOH) durchgeführt:

Lösungen	Volumen i.T. (µl)	Konzentration i.T. (mM)
0.2M Gly/KOH, pH 10 (23°C)	500	100
10mM NAD	200	2
Probelösung	n	
aqua bidest.	250 - n	
5min Vorinkubation bei (25 ± 0.2)°C		
2mM PGE_2	50	0.1

3.1.3. Enzymeinheiten

1mU entspricht der Bildung von 1nMol NADH pro min unter Standardtestbedingungen (3.1.1.). mU/ml ist die Einheit der Volumenaktivität des Enzyms, d.h. der Enzymkonzentration in der Probelösung. Die dazugehörige Einheit der spezifischen Aktivität ist mU/mg Protein.

1mIU entspricht der Bildung von 1nMol NADH pro min unter den Bedingungen des Tests für internationale Einheiten (3.1.2.). Die entsprechende Einheit der spezifischen Aktivität ist mIU/mg Protein.

Wird mindestens eine der unter 3.1.1. oder 3.1.2. angege-

benen Bedingungen im Laufe einer Meßreihe verändert, so erfolgt die Angabe der Reaktionsgeschwindigkeit v in nMol/min, bezogen auf den 1ml-Ansatz.

3.2. ISOLIERUNG EINER NAD-ABHÄNGIGEN 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE AUS HUMANPLACENTA

Zwei repräsentative Isolierungen werden hier beschrieben, die beide Modifikationen der von Rückrich (1974) und Schlegel & Greep (1975) durchgeführten Anreicherungsverfahren sind. Die zweite Isolierung wurde durch die Einführung einer hydrophoben Chromatographie ergänzt. Die Isolierungen wurden im Kühlraum bei 0-4°C durchgeführt. Den angegebenen Enzymaktivitäten liegt der Standardtest (3.1.1.) zugrunde. Bei Zentrifugationen werden stets die dem mittleren Radius entsprechenden g-Zahlen angegeben.

3.2.1. Proteinbestimmungen

260/280 in Säuleneluaten

Soweit möglich, wurde die Proteinkonzentration von Säuleneluaten durch Messung der Extinktionen bei 260 und 280nm (A_{260} bzw. A_{280}) gegen den Elutionspuffer ermittelt. Proben mit Extinktionen über 0.6 wurden mit Elutionspuffer verdünnt. Die Berechnung erfolgte nach Kalckar (1947):

$1.4 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260} = \text{mg Protein/ml}$

Amidoschwarzmethode für Proteinkonzentrationen über 0.1 mg/ml

Die Methode von Heinzel (1960) wurde wie folgt modifiziert.

Färbebad:	0.5% Amidoschwarz 10B (w/v) 45% Methanol (v/v) 45% aqua bidest. (v/v) 10% Essigsäure (v/v)
Entfärbebad:	47.5% Methanol (v/v) 47.5% aqua bidest. (v/v) 5.0% Essigsäure (v/v)
Lösungsmittel:	80% Ameisensäure (w/w) 10% Essigsäure (w/w) 10% Trichloressigsäure (TCA, w/w)

10µl Probelösung (z.T. mit 0.1n NaOH verdünnt) wurden auf einen Celluloseacetatstreifen pipettiert und getrocknet.

Die Streifen wurden 10min in das Färbebad gelegt, 3 x 2.5 min mit Entfärbebad behandelt und getrocknet. Die Flecken wurden ausgestanzt, im Lösungsmittel gelöst und gegen einen entsprechend vorbereiteten Leerwert bei 620nm gemessen. Zu jeder Meßreihe wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin aufgenommen. Es wurden Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

Amidoschwarzmethode für Proteinkonzentrationen unter 0.1 mg/ml

Die Methode von Schaffner & Weissmann (1973) wurde wie folgt modifiziert.

SDS-Puffer (pH 7.5):	250mM TRIS/HCl 0.25% SDS (w/v)
Färbelösung:	0.1% Amidoschwarz 10B (w/v) 45% Methanol (v/v) 45% aqua bidest. (v/v) 10% Essigsäure (v/v)
Entfärber:	90% Methanol (v/v) 8% aqua bidest. (v/v) 2% Essigsäure (v/v)
Elutionslösung:	25mM NaOH (v/v) 0.05mM EDTA (v/v) 50% Äthanol (v/v)

0.2ml Probelösung wurden mit 0.1ml SDS-Puffer gemischt, dann mit 0.1ml 40%iger TCA versetzt und nach erneutem Mischen 5min stehen gelassen. Die mit 2ml 5%iger TCA vermischten Ansätze wurden über einen Filtrierstutzen von 12mm Innendurchmesser (Institutswerkstatt) auf mit 5%iger TCA angefeuchtete Nitrocellulose-Filter (Selectron BA 90) mit 18mm Durchmesser abgesaugt und zweimal mit 2ml 5%iger TCA nachgewaschen. Die abgesaugten Filter wurden 6min mit 4ml Färbelösung unter mehrmaligem Mischen behandelt. Dann wurde die Färbelösung abgegossen und die Filter kurz mit ca. 5ml aqua bidest. gewaschen. Die Filter wurden fünfmal mit 5ml Entfärber für 5min von überschüssigem Farbstoff freigewaschen, danach zweimal 1min lang mit je 5ml aqua bidest. behandelt und mit einem saugfähigen Papier abgetupft. Der proteingebundene Farbstoff wurde unter mehrmaligem Mischen 2h lang mit 1.5ml Elutionslösung eluiert.

Die Messung erfolgte in 20mm MT4/QS-Küvetten mit Fuß bei 630nm gegen einen entsprechend vorbereiteten Leerwert. Zu jeder Meßreihe wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin aufgenommen. Es wurden Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

3.2.2. Phosphatbestimmung

Die Bestimmungsmethode von Baginski et al. (1970) wurde für Säuleneluate mit geringer Proteinkonzentration wie folgt modifiziert.

Lösung a: 2% Ascorbinsäure (w/v)
10% TCA (w/v)

Lösung b: 1% Ammoniummolybdat (w/v)

Lösung c: 2% Natriumcitrat (w/v)
2% Natriumarsenit (w/v)
2% Essigsäure (v/v)

Proben, deren Phosphatkonzentrationen höher als 1mM waren, wurden entsprechend verdünnt. Unter jeweiligem Mischen wurden in dieser Reihenfolge 0.1ml Probe mit 0.9ml Lösung a, 0.5ml Lösung b und 1ml Lösung c versetzt und 15min stehen gelassen. Die Messung erfolgte bei 840nm gegen einen Leerwert ohne Phosphat. Die Eichgerade wurde mit KP von pH 7.4 aufgenommen.

3.2.3. Pufferlösungen

Der pH wurde bei Zimmertemperatur im vollständigen Puffer mit konzentrierter KOH auf 7.4 eingestellt. Dies entspricht bei 0-4°C etwa pH 7.3.

Für die Isolierung I verwendete Puffer:

Puffer	KP (mM)	KCl (M)	EDTA (mM)	ME (mM)	Glycerin (%, v/v)	Sucrose (M)
A_1	10	-	1	14	20	0.25
B_1	20	-	1	5	20	-
C_1	400	-	1	5	20	-
D_1	100	-	1	10	20	-
E_1	100	1	1	10	20	-
F_1	20	-	1	10	50	-

Für die Isolierung II verwendete Puffer:

Puffer	KP (mM)	KCl (M)	EDTA (mM)	DTE (mM)	Glycerin (%, v/v)	Sucrose (M)
A_2	10	-	1	1	30	0.25
B_2	50	-	1	0.5	20	-
C_2	350	-	1	0.5	20	-
D_2	100	-	1	0.5	30	-
E_2	100	0.5	1	0.5	30	-
F_2	20	-	1	0.5	50	-
G_2	10	-	1	0.5	50	-
H_2	-	-	1	0.5	50	-
I_2	2	-	1	0.5	50	-

3.2.4. Aufarbeitung der Placenten

Die in eiskaltem Puffer A transportierte Humanplacenta (2.4.) wurde im Kühlraum auf einer mit Eis gefüllten Plastiktüte liegend von der Insertio centralis aus ca. 1h mit 1l eiskaltem Puffer A perfundiert. Dann wurden die Placentazotten von den Eihäuten abgetrennt, zerkleinert und mehrmals mit eiskaltem Puffer A gewaschen. Das Gewebe wurde im Verhältnis 1:2.5 mit z.T. gefrorenem Puffer A versetzt und in drei bis vier Portionen dreimal 30sec im Starmix bei höchster Geschwindigkeit homogenisiert. Dabei stieg die Temperatur kurzfristig an, lag aber nie über +6°C. Das Homogenat wurde 90min bei 17000xg in einer Beckman-Zentrifuge Modell J-21B zentrifugiert (Rotor JA-14, 14000rpm, 2°C). Der Überstand wurde durch Glaswolle filtriert und so der 17000xg-Überstand erhalten.

3.2.5. pH5-Fällung

Der 17000xg-Überstand wurde in einem im Eisbad stehenden, abgedeckten Becherglas unter Temperaturkontrolle langsam gerührt. Die vorher bei 0°C geeichte pH-Elektrode wurde in die Lösung eingetaucht und portionsweise 1n Essigsäure zugesetzt bis ein pH von 5.2 (Isolierung I) bzw. 5.0 (Isolierung II) erreicht war. Das Gemisch wurde 12h (Isolie-

rung I) bzw. 18h (Isolierung II) im Kühlraum stehen gelassen und anschließend 1h, wie unter 3.2.4. beschrieben, zentrifugiert. Die Niederschläge wurden in Puffer B aufgenommen und im Fall von Puffer B_1 der pH auf 7.3 eingestellt; dies war bei Puffer B_2 nicht notwendig. Das Gemisch wurde in einem geschlossenen Gefäß 5h sehr langsam gerührt und anschließend zentrifugiert (Isolierung I: Christ-Zentrifuge, Rotor 8680, 90min, 10000xg; Isolierung II: Ultrazentrifuge Spinco L 50, Rotor Ti 60, 9h,200000xg). Der Überstand wurde als pH5-Fällung beim folgenden Schritt eingesetzt.

3.2.6. Sephadex-G-50-/DEAE-Cellulose-Chromatographie

Die pH5-Fällung wurde mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 bis 1.5ml/min auf eine mit Puffer B äquilibrierte (4x48)cm Sephadex-G-50-coarse-Säule aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Der Auslauf dieser Säule war über einen Dreiweghahn zur Probeentnahme direkt mit dem Kopf einer Säule verbunden, die vorschriftsmäßig vorbereitete und mit Puffer B äquilibrierte DEAE-Cellulose DE 23 (Whatman) enthielt. Die Gelabmessungen betrugen im Fall der Isolierung I (6x12)cm und bei der Isolierung II (4x14)cm. Nachdem die Proteinkonzentration im Eluat der Sephadex-G-50-Säule auf ca. 15% abgesunken war, wurden die beiden Säulen entkoppelt und die DEAE-Cellulose-Säule mit Puffer B nachgewaschen bis die Extinktion des Eluats gegen Puffer B bei 280nm unter 0.01 gesunken war. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten zwischen Puffer B und Puffer C, dessen Gesamtvolumen 1400ml (Isolierung I, 1.5ml/min) bzw. 600ml (Isolierung II, 0.6ml/min) betrug. Anschließend wurde mit Puffer C nachgewaschen. Die 10ml-Fraktionen mit guter spezifischer Aktivität und Volumenaktivität wurden zum DEAE-Cellulose-Pool vereinigt.

3.2.7. Ammoniumsulfatfällung

Isolierung I

Bei der Isolierung I wurde eine 30%-Vorfällung durchgeführt. In einem verschlossenen Gefäß wurde der DEAE-Cellu-

lose-Pool unter Rühren mit 0.4µl ME pro ml und dann portionsweise mit 0.173g Ammoniumsulfat pro ml versetzt. Die Fällung wurde 8h stehen gelassen und 45min bei 10000xg (Christ-Zentrifuge, Rotor 8680) zentrifugiert.

Der Überstand der 30%-Fällung wurde zur 60%-Fällung in gleicher Art mit 0.195g Ammoniumsulfat pro ml versetzt, 18h stehen gelassen und 1h bei 50000xg (Spinco L 50, Rotor SW 27) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in Puffer D aufgenommen, 10h stehen gelassen, 45min bei 10000xg (Christ-Zentrifuge, Rotor 8680) zentrifugiert und der Überstand als $(NH_4)_2SO_4$-Fällung I erhalten.

Isolierung II

Der DEAE-Cell.-Pool II wurde in gleicher Art wie oben zur 60%-Fällung mit 18mg DTE und dann portionsweise mit 0.375g des Salzes pro ml verrührt, 48h stehen gelassen und im Verhältnis 1.2 : 1 mit einer Lösung aus 60%igem $(NH_4)_2SO_4$, 1mM EDTA, 0.5mM DTE verdünnt. Dann wurde die Fällung 1h bei 10000xg (Christ-Zentrifuge, Rotor 8680) zentrifugiert und der Niederschlag in Puffer D aufgenommen. Die erhaltene Suspension wurde 9h in einem verschlossenen Gefäß vorsichtig gerührt, 2h bei 14000xg (Christ-Zentrifuge, Rotor 8510) zentrifugiert und der Überstand als $(NH_4)_2SO_4$-Fällung II erhalten.

3.2.8. Sephadex-G-100-Chromatographie

Es wurde eine (3x190)cm-Säule mit Auftragsbecher eingesetzt. Die $(NH_4)_2SO_4$-Fällung wurde mit einer Pipette auf das mit Puffer D äquilibrierte Gel aufgetragen und mit Puffer D eluiert (28ml/h bei der Isolierung I; 15ml/h bei der Isolierung II). Die 10ml-Fraktionen mit guter spezifischer Aktivität wurden zum Sephadex-G-100-Pool vereinigt.

3.2.9. DEAE-Sephadex-A-50-Chromatographie

Der Sephadex-G-100-Pool wurde mit 15ml/h über einen Adapter auf eine mit Puffer D äquilibrierte 134ml-DEAE-Sephadex-A-50-Säule ((2.6x25)cm bei Isolierung I; (3x19)cm bei Iso-

lierung II) aufgetragen und mit zwei Säulenvolumen Puffer D nachgewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten zwischen Puffer D und Puffer E von 520ml Gesamtvolumen (15ml/h). Anschließend wurde mit Puffer E nachgewaschen. Die 10ml-Fraktionen mit guter spezifischer Aktivität wurden vereinigt und zweimal 7h gegen 2l Puffer F_1 (Isolierung I) bzw. dreimal 6h gegen 1.1l Puffer F_2 (Isolierung II) dialysiert und so der A-50-Pool I und der A-50-Pool II erhalten.

3.2.10. Hydrophobe Chromatographie

Bei Octyl- und Phenyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia) sind die Octyl- bzw. Phenylgruppen über Glyceryldiäther als "Spacer" ($-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-$) an die Agarosematrix gebunden. Die Ligandenkonzentration beträgt ungefähr 40µMol/ml Bettvolumen. Die Gele aller drei hydrophoben Säulenchromatographien wurden mit Puffer F_2 äquilibriert. Es wurden 1ml-Fraktionen aufgefangen. Als Säulen wurden 1ml-Einmalspritzen (0.5x6)cm und eine 2ml-Einmalspritze (1x3)cm eingesetzt.

Octyl-Sepharose-Lauf

250mU A-50-Pool II wurden auf eine 0.9ml Octyl-Sepharose-CL-4B-Säule aufgetragen (0.5ml/h) und mit 10ml Puffer F_2 nachgewaschen. Es folgte eine Stufe mit 13ml Puffer H_2 und dann wurde mit Puffer I_2 eluiert. Die Tritonkonzentration im Eluat wurde über die Messung der Extinktion bei 276nm ermittelt (Proteinkonzentration $\approx$ 0.05mg/ml!), nachdem die Fraktionen entsprechend verdünnt worden waren.

Phenyl-Sepharose-Probelauf

250mU A-50-Pool II wurden auf eine 0.75ml Phenyl-Sepharose -CL-4B-Säule aufgetragen (1ml/h) und mit 15ml Puffer F_2 nachgewaschen. Nach einer Stufe von 4ml Puffer G_2 wurde mit Puffer H_2 eluiert.

Phenyl-Sepharose-Hauptlauf

840mU A-50-Pool II wurden auf eine 1.8ml Phenyl-Sepharose-CL-4B-Säule aufgetragen (1ml/h) und mit 19ml Puffer F_2

nachgewaschen. Auf eine Stufe mit 8ml Puffer G_2 folgte ein absteigender konkaver Phosphatgradient von Puffer G_2 zu Puffer H_2 (1ml/h). Dazu wurde ein geschlossenes 3ml-Gefäß mit Magnetrührer, das mit Puffer G_2 gefüllt war, einerseits mit dem Säulenkopf und andererseits mit einem offenen Vorratsgefäß mit Puffer H_2 verbunden. Die Phosphatkonzentration wurde im Eluat nach 3.2.2. gemessen. Fünf aktive Fraktionen wurden zum Phenyl-Seph.-Pool vereinigt.

3.2.11. Analytische Disk-Elektrophorese

Die analytische Disk-Elektrophorese wurde in einer Flachgelapparatur 146200 von DESAGA durchgeführt. Es wurden ein pH 8.5/7%-Gel und ein pH 8.5/9.8%-Gel eingesetzt, welche Modifikationen des Gelsystems 1a nach Maurer (1971) waren. In beiden Fällen enthielt das Sammelgel 8.3% und das Trenngel 12.5% Glycerin. Alle verwendeten Lösungen wurden durch Whatman-Glasfaserfilter GF/C filtriert. Der pH der Gelpuffer wurde bei 0-4°C eingestellt; zur Frontanfärbung diente Bromphenolblau. Die Trennung erfolgte bei konstanter Spannung von 300V unter Kühlung durch zirkulierendes eiskaltes Wasser. Die Proben enthielten 50% Glycerin und wurden in Volumen zwischen 50 und 200µl aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in Laufrichtung zerschnitten und entweder eine Proteinanfärbung nach König et al. (1970) oder eine Modifikation der Aktivitätsanfärbung von Schlegel et al. (1974) durchgeführt.

Inkubationsansatz der Aktivitätsanfärbung

Lösungen	Volumen i.T. (ml)	Konzentration i.T. (mM)
1M TRIS/HCl, pH 7.9 (20°C)	5	500
20mM NAD	1	2
aqua bidest.	1.8	
2mM PGE_2 in 50mM KP, pH 6.9	0.2	0.04
2mM Nitroblautetrazoliumchorid	1	0.2
1.6mM Phenazinmethosulfat	1	0.16

Zur Aktivitätsanfärbung wurden die Gelstreifen in der Dunkelheit in 10ml frisch pipettiertem Inkubationsansatz 1h bei 37°C und pH 7.4 i.T. inkubiert, danach die Gele mehrmals mit aqua bidest. gewaschen und in 2%iger Essigsäure aufgehoben. Einige Aktivitätsanfärbungen wurden zeitweilig in die Entfärbelösung der Proteinanfärbung überführt, um den gleichen Schrumpfungsgrad der Gele zu erreichen.

3.2.12. Versuche zur Affinitätschromatographie

NAD-Agarose (SIGMA) enthält über die Hydroxylgruppen der Ribose mit Hilfe eines "6-C-Spacers" an Agarose gebundenes NAD in einer Konzentration von 4µMol/ml Gel. Bei der NAD-Agarose (SERVA) handelt es sich um AGNAD™ Type 3 von P-L Biochemicals, bei der das NAD an der C-8-Position des Adenins über einen "Hexan-Spacer" an die Agarose gebunden ist (1-4µMol NAD/ml Agarose, vgl. Lee et al.,1974). Je 1ml Gel wurden in eine 1ml-Einmalspritze (0.5x6)cm gefüllt und mit Puffer F äquilibriert. Dann wurden 140mU A-50-Pool I (NAD-Agarose, SIGMA) bzw. 200mU A-50-Pool II (NAD-Agarose, SERVA) mit 0.4-0.5ml/h aufgetragen und mit Puffer F nachgewaschen.

3.3. KONTROLLUNTERSUCHUNGEN

3.3.1. Reinheitskontrolle der Prostaglandine durch Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie der PG erfolgte auf vorgefertigten Kieselgel-Platten DC-Karten SI von RIEDEL DE HÄEN, die 2h bei 110°C hitzeaktiviert worden waren, oder Polygram SIL 6/UV_{254} bzw. Nano-Platten Sil-20 von MACHERY, NAGEL & Co. Folgende Laufmittel wurden verwendet:

I Benzol-Dioxan-Eisessig 20:20:1 (Gréen & Samuelsson,1964)
II Benzol-Dioxan-Eisessig 20:10:1 (Andersen,1969)
III Essigester-n-Hexan-Eisessig 130:70:3 (UPJOHN COMPANY)
IV n-Hexan-Äther-Eisessig 2:2:1 (Baier,1977)

Die Reinheitskontrolle der für kinetische Messungen verwendeten PG, PG-Analogen und PG-Metabolite wurde mit mindestens einem der genannten Laufmittel auf mindestens einer

der genannten Dünnschichtplatten durchgeführt. Dazu wurde 2-5µl der Substanz in dem für den entsprechenden Versuch verwendeten Lösungsmittel (Äthanol, Puffer etc.) aufgetragen. Die Nano-Platten wurden 7cm und die anderen Dünnschichtplatten 12-14cm entwickelt und danach an der Luft getrocknet.

Bei Platten mit Fluoreszensindikator wurde PGB_1 im UV identifiziert. PGD_2 und 15KPGE wurden 5-15min in NH_3-Atmosphäre "angefärbt". Die Platten wurden besprüht mit 10%iger äthanolischer Phosphormolybdänsäure-Lösung (Andersen,1969) oder Anisaldehyd-Reagenz (Kiefer et al.,1975), das durch Vermischen von 1ml Anisaldehyd und 9ml Äthanol mit 1ml konzentrierter Schwefelsäure unter Eiskühlung hergestellt wurde. Danach wurden sie im Trockenschrank bei 110 bzw. 90°C erhitzt bis deutliche Flecken zu erkennen waren.

3.3.2. Auftrennung von Reaktionsgemischen durch Dünnschichtchromatographie

In 2ml-Ansätzen wurden 1mM PGD_2, 0.5mM $PGF_{2\alpha}$, 0.5mM PGE_1 oder 0.1mM PGA_1 mit 1mM NAD und 15 - 60mIU A-50-Pool I in 100mM TRAP bei pH 7.4 und 37°C für 20min inkubiert. Entsprechend wurden 0.5mM $15KPGE_1$ mit 0.1mM NADH angesetzt. Entsprechend wurden Vergleichsansätze, in denen das Enzym durch Puffer F_1 ersetzt war oder NAD fehlte, behandelt.

Die Inkubation wurde im Eisbad gestoppt, die Ansätze mit 1n HCl auf pH 3.5 gebracht und zweimal mit 5ml Essigester extrahiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation in der Stockzentrifuge bei Stufe VI. Die vereinigten Essigesterextrakte wurden mit 1ml aqua bidest. gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Rotationsverdampfer bei Zimmertemperatur auf 10-40µl oder bis zur Trockne eingeengt. In letzterem Fall wurde der Rückstand mit Äthanol aufgenommen. 5-10µl davon wurden parallel zu den verfügbaren Referenzsubstanzen auf hitzeaktivierte DC-Karten SI aufgetragen und mit Laufmittel I (3.3.1.) aufgetrennt. Die Platten wurden nach dem Trocknen in NH_3-Atmosphäre gestellt, mit 10%iger äthanolischer Phosphormolyb-

dänsäure besprüht oder es wurden unbehandelte Bereiche ausgeschnitten und mit Essigester eluiert.

3.3.3. UV-VIS-Spektren

Spektren wurden in 1ml-MT4/QS-Küvetten in einem Unicam SP 1800 Doppelstrahlphotometer mit Schreiber Unicam AR 25 Linear Recorder zwischen 250 und 750nm gegen das entsprechende Lösungsmittel als Referenz aufgenommen. Es wurden z.B. Spektren von hochangereicherter 15HPGDH in Puffer F_1 oder von Substanzen, die unter bestimmten Pufferbedingungen über ihre λ_{max} semiquantitativ erfaßt werden sollten (Triton, Cytochrom c, Myoglobin, etc.), gemessen.

Zur Überprüfung des Reaktionsprodukts der enzymatischen Reaktion zwischen PGD_2 und NAD wurden der Ansatz und die Kontrollansätze (3.3.2.) nach der Einstellung auf pH 3.5 mit je 1ml Essigester extrahiert. Danach erfolgte eine Rückextraktion bei pH 8 bzw. pH 9 in je 1ml 0.1M KP. Der pH8-Extrakt wurde mit 1n HCl stufenweise auf pH 6 bzw. pH 3.5 zurückgestellt. Vom Essigesterextrakt und den KP-Extrakten bei verschiedenen pH-Werten wurden Spektren, wie oben beschrieben, aufgenommen.

3.3.4. Optische Tests zur Untersuchung von Enzymfraktionen auf "Fremdaktivitäten"

Alkohol- und Lactat-Dehydrogenase wurden nach Bergmeyer (1970) bestimmt. Zur Messung der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität wurde der Test von Jarabak (1969) geringfügig modifiziert oder im Standardtest (3.1.1.) PGE_2 durch 0.05mM 17ß-Östradiol ersetzt.

Zur Ermittlung von NAD-Reduktase-Aktivität wurden unter Standardbedingungen (3.1.1.) 2 bzw. 0.05mM NAD mit Enzym (ohne PG!) gegen einen Leerwert, der kein Enzym enthielt, gemessen. Die Bestimmung der NADH-Oxidase-Aktivität erfolgte entsprechend, nur daß NAD durch 0.2mM bzw. 0.01mM NADH ersetzt wurde.

Zur Messung der NADP-abhängigen 15HPGDH-Aktivität wurde im Standardtest (3.1.1.) 2mM NAD durch 2mM NADP ersetzt.

Die Hinreaktion einer möglicherweise vorhandenen NADH-abhängigen PGE-9-Keto-Reduktase wurde photometrisch durch Inkubation von 0.1 bzw. 0.02mM PGE_2 oder 15-Methyl-PGE_2 mit 0.2mM NADH und Enzym unter Standardbedingungen (3.1.1.) verfolgt. Entsprechend wurden für eine eventuell mögliche Rückreaktion 2.5, 0.1 und 0.01mM 15-Methyl-$PGF_{2\alpha}$ und 2mM NAD eingesetzt (vgl. Kröner & Peskar,1976).

3.4. UNTERSUCHUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG EINER 15-HYDROXY-PROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE

3.4.1. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Das Molekulargewicht (MG) der 15HPGDH wurde nach Andrews (1964) durch Gelfiltration über Sephadex G-100 in einem Puffer von pH 7 bestimmt, der 100mM TRAP, 1mM DTE und 30% Glycerin enthielt. Die Gelabmessungen betrugen (1.4x96)cm und die Laufgeschwindigkeit 5ml/h. 140mIU A-50-Pool I wurden in 0.8ml Gesamtvolumen aufgetragen. Als Eichproteine dienten 0.05mg alkalische Phosphatase aus Escherichia coli (MG 74000), 5.8mg Rinderserumalbumin (MG 67000), 4mg Ovalbumin (MG 45000), 1.5mg Myoglobin (MG 17800) und 1.5mg Cytochrom c aus Pferdeherz (MG 12400). Die MG wurden aus der Arbeit von Andrews (1964) entnommen. Alkalische Phosphatase wurde nach Garen & Levinthal (1960) gemessen. Die Albumine wurden über die Extinktionen bei 260 und 280nm (vgl. 3.2.1.) und Myoglobin und Cytochrom c über die Extinktionen bei 416nm bestimmt (vgl. 3.3.3.).

3.4.2. Stabilisierung durch NAD und Stabilität des Enzyms

Je 100µl einer gegen Puffer F_2 dialysierten pH5-Fällung wurden mit 50µl 60mM KP, pH 7.4 und 100µl 0, 1, 2.5, 5 und 10mM NAD (pH 7) vermischt. Dadurch enthielten alle Gemische 20mM KP, 0.4mM EDTA, 0.2mM DTE und 20% Glycerin und unterschieden sich nur durch ihre NAD-Konzentrationen von 0, 0.4, 1, 2 oder 4mM. Die Gemische wurden in verschlossenen Eppendorf-Hütchen bei 4°C aufbewahrt und nach 1, 8 bzw. 16 Tagen mit dem Standardtest (3.1.1.) gemessen. Dieser wurde auch bei den Stabilitätsmessungen eingesetzt.

3.4.3. Beeinflussung der enzymatischen Aktivität durch verschiedene Faktoren

Die Durchführung der Messungen und ihre Auswertung erfolgte nach 3.1. mit der Ausnahme der pH-Kurve der 15HPGDH-Rückreaktion, bei der das Verschwinden von NADH entsprechend verfolgt wurde. Die genauen Testbedingungen (Testbdgn.) sind in den Legenden der Abbildungen und Tabellen oder dem Text des Ergebnisteils (4.4.3.-4.4.7.) aufgeführt.

Bei der Messung des Einflusses von Zusätzen (Salze, Inhibitoren, Aktivatoren etc.) auf die 15HPGDH-Aktivität wurden diese mit Puffer, NAD und Enzym 5min vorinkubiert und dann die Reaktion mit PG gestartet. Dabei wurde darauf geachtet, daß der pH i.T. stets 7.4 war und eventuell ein Puffer mit geändertem pH in den Ansatz pipettiert, um dies zu erreichen (Salzeffekte!).

Bei der Messung der pH-Kurven wurde der pH ebenfalls im Ansatz selbst kontrolliert oder bei Testtemperatur in einem Vergleichsansatz, in dem das Enzym durch seinen Aufbewahrungspuffer (F) ersetzt war (nur sehr geringe Proteinkonzentrationen i.T.!). Wenn notwendig, wurde dabei der Temperaturgang der Eichpuffer zwischen 20°C und 37°C in Rechnung gestellt.
Bei der Messung der Temperaturabhängigkeit wurde die Temperatur in einer Vergleichsküvette gemessen, die sich im Küvettenhalter direkt naben der Meßküvette befand. Es wurde ein Thermometer mit geringer Masse eingesetzt. Auch hier wurde pH 7.4 i.T. bei jeder Temperatur eingehalten. Zur Ermittlung der Arrhenius-Aktivierungsenergie E_A konnte in der Gleichung $d \log k = - E_A(2.303R)^{-1}d(T^{-1})$ die Geschwindigkeitskonstante k durch die Anfangsgeschwindigkeit v ersetzt werden, da diese beiden Veränderlichen proportional zueinander sind und sich die Steigung im Arrhenius-Diagramm damit nicht ändert (Dixon & Webb,1967). Daher konnte E_A aus der Steigung (St.) der Abb.15 über $E_A = -2.303RSt.$ errechnet werden. Die molare Aktivierungsenthalpie $\Delta H^{\ddagger}$ hängt mit E_A über $\Delta H^{\ddagger} = E_A - RT$ zusammen (Dixon & Webb,1967).

Die Äthanol- und Glycerinhemmungen wurden nach Dixon (1953) und die Substratabhängigkeiten in Gegenwart von Triton nach Lineweaver & Burk (1934) aufgetragen.

3.5. STEADY-STATE-UNTERSUCHUNGEN DER HINREAKTION EINER 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE

3.5.1. Nomenklatur und Abkürzungen enzymkinetischer Größen und Begriffe

[A]	Konzentration von A (mit Ausnahme der Computerdiagramme)
v	Anfangsgeschwindigkeit
V_1	extrapolierte Maximalgeschwindigkeit der Hinreaktion
V_2	extrapolierte Maximalgeschwindigkeit der Rückreaktion
V^A_{max}	Maximalgeschwindigkeit für das Substrat A bei einer bestimmten endlichen Konzentration des anderen Substrats
K^A_m	limitierende Michaeliskonstante für das Substrat A für "unendliche" Konzentrationen des anderen Substrats
$K^A_{m\,app}$	scheinbare Michaeliskonstante für das Substrat A bei einer bestimmten endlichen Konzentration des anderen Substrats
K^A_s	Dissoziationskonstante für das Substrat A (Substratkonstante)
K^A_i	Inhibitorkonstante für A
K^A_{iOa}	Inhibitorkonstante für A für Ordinatenanschnitte (vgl. Cleland,1970)
K^A_{iSt}	Inhibitorkonstante für A für Steigungen (vgl. Cleland,1970)
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante der Reaktion
k	Geschwindigkeitskonstante
E_t	totale Enzymkonzentration

Ansonsten folgen Nomenklatur und Definitionen denen von Cleland (1970), wenn ein anderer Autor nicht speziell genannt wird. Insbesondere gilt dies für die Reaktionsmechanismen und Hemmtypen.

3.5.2. Durchführung der kinetischen Messungen

Von wenigen Ausnahmen abgesehen wurden die in Kapitel 4.5. dargestellten Ergebnisse erhalten, indem analog zu 3.1. die NADH-Bildung bei 340nm in 100mM TRAP bei pH 7.4 und (37 ± 0.2)°C verfolgt wurde. Die Ausnahmen waren:
a) Zur Ermittlung des Lineweaver-Burk-Diagramms für PGD_2 wurden die Anfangsgeschwindigkeiten bei pH 8 (100mM TRAP) über die Extinktionszunahme bei 420nm ermittelt (Rückrich et al.,1976a).
b) Die enzymatische Bildung von Ac-NADH aus Ac-NAD (3-Acetylpyridin-NAD) wurde in 400mM TRAP, pH 7.4, bei (25 ± 0.2) °C über die Extinktionszunahme bei 365nm verfolgt. Ein Extinktionskoeffizient von 9.1$cm^2/\mu Mol$ wurde zugrunde gelegt (Bergmeyer,1970).
c) Die kinetischen Konstanten für Thionicotinamid-NAD (S-NAD) als Substrat der 15HPGDH wurden über die Verfolgung der S-NADH-Bildung bei 398nm ermittelt (Extinktionskoeffizient: 11.9$cm^2/\mu Mol$; Stein et al.,1963).
d) Die Konkurrenz von S-NAD mit der enzymatischen Reaktion zwischen NAD und PGE_2 wurde bei 342nm, dem isosbestischen Punkt für S-NAD und S-NADH, gemessen (Rudolph & Fromm, 1970).

Aus den Tabellen oder Abbildungslegenden des Ergebnisteils können die jeweils eingesetzten Enzymfraktionen bzw. Substrat- und Inhibitorkonzentrationen entnommen werden. Die für kinetische Messungen verwendeten Enzymfraktionen sind in Tab.4 zusammenfassend charakterisiert. Inhibitoren wurden zusammen mit Puffer, NAD und Enzym 5min bei 37°C vorinkubiert und die Reaktion mit PG gestartet.

$PGF_{2\alpha}$, seine Metabolite und Analogen sowie die Endoperoxid-Analogen U-44069 und U-46619 wurden mit 50mM TRAP gelöst und verdünnt, wobei der pH der Lösungen auf ca. 7.5 eingestellt wurde. Lösungen der PGE, ihrer Metabolite und Analogen sowie PGA_1 und PGB_1 wurden mit 50mM KP hergestellt und ein pH von 6.6 bis 6.9 in den einzelnen Lösungen eingehalten (vgl. Roseman et al.,1973; Hajratwala,1975). Eine Ausnahme bildet nur $15KPGE_1$ (Abb.49), dessen Lösungen

(pH 6.6) 20mM KP und 4% Äthanol enthielten. 50µl dieser 15KPGE$_1$-Lösungen wurden in den Testansatz pipettiert (vgl. Rückrich et al.,1976b). PGD$_2$- und TXB$_2$-Lösungen wurden mit Äthanol angesetzt. Die PG-Lösungen wurden weitgehend vor Licht geschützt. Für kinetische Messungen wurden nur frisch pipettierte PG- und NADH-Verdünnungsreihen verwendet. Die Reinheitskontrolle der PG erfolgte nach 3.3.1.

3.5.3. Auswertung der kinetischen Messungen

Die Anfangsgeschwindigkeiten (v) der einzelnen Reaktionen wurden, wie unter 3.1. beschrieben, ermittelt und in nMol/min angegeben. Eine Ausnahme bilden auch hier die Messungen mit PGD$_2$ (Abb.33), bei denen v wegen des fehlenden Extinktionskoeffizienten des bei 420nm und pH 8 gemessenen Produkts in ΔE/min angegeben wurde.

Eine etwaige Folge- oder Rückreaktion wurde auf Grund der Messungen von Anfangsgeschwindigkeiten nicht in Rechnung gestellt. Die Voraussetzung von Cleland (1970) für Steady-State-Bedingungen, daß die Anfangsgeschwindigkeit in kurzen Zeitintervallen konstant sein soll, war hier in allen Fällen erfüllt.

Die Datensätze der vollständigen Anfangsgeschwindigkeitsmuster NAD/PG wurden mittels gewichteter linearer Regressionsanalyse (Rückrich et al.,1975) unter Verwendung eines Computerprogramms nach Wilkinson (1961) und Cleland (1963c) an der allgemeinen Gleichung für die Hinreaktion von Bisubstratreaktionen "gefittet":

$$v = \frac{V_1 [A][B]}{K_s^A K_m^B + K_m^A [B] + K_m^B [A] + [A][B]}$$

Ein Gleichgewichtsfaktor ν^4 wurde eingesetzt, um der durch Mehrfachbestimmungen ermittelten homogenen Varianz in der Bestimmung von v gerecht zu werden (Cleland,1963c). Der CDC-3300-Computer (Fortran) zeichnete die optimalen Geraden in den konventionellen doppelt reziproken Primärdiagrammen nach Lineweaver & Burk (1934) und berechnete die kinetischen Konstanten mit ihren Standardabweichungen.

Das selbe Verfahren wurde zur Auswertung der S-NAD/PGE_2-Kreuzserie verwendet.

Alle anderen Meßreihen wurden graphisch manuell ausgewertet. Die kinetischen Konstanten für PGD_2 und Ac-NAD als Substrate der 15HPGDH wurden nach Lineweaver & Burk (1934) ermittelt. Die Berechnung der Inhibitorkonstanten erfolgte unter Annahme eines Ordered Bi Bi Mechanismus mit NAD als führendem Substrat für die durch 15HPGDH katalysierte Reaktion. K_i^{PGB1} wurde aus Abb.34 unter Verwendung der Gleichung IV-28 nach Fromm (1975) für einen kompetitiven "dead-end"-Inhibitor, der an den E•NAD-Komplex bindet, nach folgender Formel berechnet: $K_i = K_{iSt}/(1 + K_s^{NAD}/[NAD])$. Die Produkthemmungen wurden nach Cleland (1963b) ausgewertet mit $K_i^{NADH} = K_{iSt}^{NADH}$ (Abb.45,46) und $K_i^{15KPG} = K_{i0a}^{15KPG} / (1 + K_m^{NAD}/[NAD])$ (Abb.48-50). Entsprechend erfolgte auch die Bestimmung des K_i des alternativen Produkts 15K13,14-$DPGF_{2\alpha}$. Aus dem Dixon-Diagramm der NADH-Hemmung (Abb.53) wurde K_i^{NADH} als Abszissenabschnitt des Schnittpunkts der Geraden durch den linearen Bereich mit einer Parallelen zur Abszisse im Abstand $(1 + K_m^{PG}/[PG])/V_1$ ermittelt (nicht gezeigt). Dies entspricht der Anwendung der Methode von Dixon (1953) für kompetitive Hemmungen auf eine Bisubstratreaktion mit dem oben erwähnten Mechanismus, wobei $K_i = -i$ in Gleichung (11) nach Cleland (1963b) eingesetzt wird.

Die "Hemmung" der NAD/PGE_2-Reaktion durch das alternative Substrat S-NAD (Abb.44) wurde nach Fromm (1975) ausgewertet. Seine Gleichung V-67 kann für den Fall, daß 1/v (y) gegen $1/[PGE_2]$ (x) aufgetragen wird, in folgende allgemeine Gleichung umgeformt werden: $y = (ax^2 + bx + c) / (dx + e)$. In dieser Gleichung sind a bis e Funktionen der Konzentration von NAD und/oder S-NAD sowie verschiedener kinetischer Konstanten. Für eine feste NAD- und eine feste S-NAD-Konzentration sind a bis e also selbst Konstanten. In Abwesenheit von S-NAD nimmt die Gleichung Geradenform an. Bei einer endlichen S-NAD-Konzentration hat die Gleichung die Form einer 2/1-Funktion nach der Definition von Cleland (1963b).

Die Beziehung zwischen den reziproken Abszissenabschnitten $[NAD]_{SP}$ der Schnittpunkte in den Primärdiagrammen der Hemmungen von $15KPGE_2$ gegenüber NAD und den dazugehörenden fixierten PGE_2-Konzentrationen kann wie folgt dargestellt werden. Für die Produkthemmung von P bei variablem A im Rahmen eines Ordered Bi Bi Mechanismus gilt Gleichung (9) nach Cleland (1963b). In dieser Gleichung wird, gemäß einer der Schnittpunktsbedingungen, 1/v für P = 0 und P = 1 gleichgesetzt. Durch Vereinfachung der erhaltenen Gleichung resultiert:

$$[NAD]_{SP} = -K_s^{NAD}/(1 + K_m^{15KPGE2}K_s^{NADH}[PGE_2]/K_s^{15KPGE2}K_m^{NADH}K_m^{PGE2}).$$

Daraus folgt, daß in einem Ordered Bi Bi Mechanismus die gegen $(1 + K_m^{15KPGE2}K_s^{NADH}[PGE_2]/K_s^{15KPGE2}K_m^{NADH}K_m^{PGE2})^{-1}$ aufgetragenen reziproken Abszissenabschnitte der bei den entsprechenden festen PGE_2-Konzentrationen ermittelten Schnittpunkte auf einer Ursprungsgeraden liegen müssen.

3.6. STEADY-STATE-UNTERSUCHUNGEN ZUR RÜCKREAKTION EINER 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE

3.6.1. Durchführung der kinetischen Messungen

Die Geschwindigkeit der Rückreaktion der 15HPGDH wurde über die NADH-Abnahme bei 340nm analog zu 3.1. ermittelt. Im Rahmen der Vorversuche wurde der A-50-Pool I als Enzym eingesetzt. Zur Abschätzung der K_m^{15KPG}app (0.05mM NADH, 100mM TRAP, pH 7.4) wurden 0.05, 0.01 und 0.5mM $15KPGE_1$ (1% Äthanol i.T.) bzw. 0.6, 1.2 und 3mM $15K13,14DPGF_{2\alpha}$ eingesetzt.

Die Messung der NADH/$15KPGE_2$-Kreuzserie erfolgte in 100mM TRAP bei pH 7.4 und 37°C mit A-50-Pool II, wobei NADH in acht Schritten zwischen 0.005 und 0.217mM und $15KPGE_1$ in fünf Schritten zwischen 0.02 und 0.1mM variiert wurden. Die NADH-Lösungen wurden in 50mM TRAP auf pH 7.6 und die $15KPGE_2$-Lösungen in 50mM KP auf pH 6.6 bis 6.9 eingestellt. Beide Verdünnungsreihen wurden am Versuchstag aus den Festsubstanzen frisch hergestellt.

3.6.2. Auswertung der kinetischen Messungen

Die kinetischen Messungen zur Rückreaktion wurden graphisch manuell ausgewertet, wobei für "Vorversuche" die Methode von Lineweaver & Burk (1934) verwendet wurde. Die Auswertung der NADH/15KPGE$_2$-Kreuzserie erfolgte nach Segel (1975) unter Annahme einer kompetitiven Substrathemmung durch NADH im Rahmen eines Ordered Bi Bi Mechanismus. V_2, die K_m und K_s^{NADH} wurden aus Abb.57 und $K_s^{15KPGE2}$ als reziproker Abszissenabschnitt des Schnittpunkts der Geraden 1-5 aus Abb.56 entnommen. Die Berechnung der Hemmkonstante für NADH als Substratinhibitor erfolgte mit Hilfe des Minimums aus Abb.57b nach $K_i = [NADH]^2_{min} / K_s^{NADH}$.

3.6.3. Berechnung der Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten

Die Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten der 15HPGDH-katalysierten Reaktion NAD + PG $\rightleftharpoons$ NADH + 15KPG wurden für E_2 und $F_{2\alpha}$ über die von Cleland (1963a) für einen Ordered Bi Bi Mechanismus angegebenen Gleichungen errechnet, wobei für $F_{2\alpha}$ einige von Baier (1977) ermittelte kinetische Konstanten mit herangezogen wurden. Die Multiplikation der erhaltenen Gleichgewichtskonstanten mit 40nM, der Wasserstoffionenkonzentration bei pH 7.4, führte zur Gleichgewichtskonstanten der Gleichung NAD^+ + PG $\rightleftharpoons$ NADH + H^+ + 15KPG.

4. ERGEBNISSE

4.1. AKTIVITÄTSTEST FÜR NAD-ABHÄNGIGE 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE

Die Zeit/Umsatzkurven des Standardtests (3.1.1.) waren unabhängig von der eingesetzten Enzymfraktion, je nach der im Ansatz verwendeten Enzymkonzentration, zwischen 4 und 12min linear. Die Reaktion war pseudo-nullter Ordnung, da fast unter Substratsättigung gemessen wurde und das Enzym hier stabil war. Gegen einen Pufferleerwert war weder eine Spontanreaktion zwischen NAD und PG noch eine Reaktion zwischen NAD und Enzym oder PG und Enzym festzustellen. Die durch diesen Test ermittelten Aktivitäten waren um den Faktor 0.95 geringer als diejenigen des Aktivitätstests für internationale Einheiten (3.1.2.). Messungen unter den Bedingungen des letzteren waren nur ca. 3min linear und bei der Vorinkubation von NAD mit einigen geringfügig angereicherten Enzymfraktionen zeigte sich eine zeitabhängige, nichtlineare Extinktionszunahme gegen einen Pufferleerwert. Der Standardtest war beim Vergleich solcher Enzymfraktionen besser reproduzierbar.

4.2. ISOLIERUNG EINER NAD-ABHÄNGIGEN 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE AUS HUMANPLACENTA

4.2.1. Ausgangswerte und Anreicherung des Enzyms

In den 17000xg-Überständen von sieben Isolierungen wurden folgende Durchschnittswerte mit ihren Standardabweichungen ermittelt: (5800 $\pm$ 920)mg Gesamtprotein, (34000 $\pm$ 6000)mIU Gesamtaktivität und eine spezifische Aktivität von (5.9 $\pm$ 1.7)mIU/mg Protein. In einem Fall konnten aus dem 17000xg-Niederschlag mit Puffer A_2 unter Verwendung eines Potter-Elvehjem-Homogenisators 16% Enzymaktivität nachextrahiert werden, wobei die spezifische Aktivität allerdings nur noch halb so groß war. Aus dem Niederschlag dieser Extraktion konnten mit 2.5% Triton in Puffer A_2 nur noch weitere 3% Enzymaktivität erhalten werden. Eine Placenta sollte 35000 bis 55000mIU NAD-abhängige 15HPGDH enthalten.

Ausgehend vom jeweiligen 17000xg-Überstand wurde das Enzym einschließlich der DEAE-Sephadex-A-50-Chromatographie bei der Isolierung I (Tab.1) 865-fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 5200mIU/mg Protein und bei der Isolierung II (Tab.2) 980-fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 4300mIU/mg Protein angereichert. Die Placenta der Isolierung II enthielt mehr Blut als die der Isolierung I und konnte weniger vollständig perfundiert werden: die spezifische Aktivität im Zentrifugationsüberstand war hier schlechter.

Unter Einbeziehung des Phenyl-Sepharose-Hauptlaufs, der nur mit einem Teil des A-50-Pool II durchgeführt wurde, wurde, bezogen auf den 17000xg-Überstand, für die Isolierung II eine fast 10000-fache Gesamtanreicherung bis zu einer spezifischen Aktivität von 43000mIU/mg Protein bei einer Ausbeute von 10% erzielt (Tab.2).

4.2.2. Einzelergebnisse einiger Anreicherungsschritte

Die beschriebenen Säurefällungen führten zur Entfernung des meisten Fremdproteins. Dieser Effekt war bei der pH5-Fällung der Isolierung II mit fast 6g (90%) höher als bei der pH5.2-Fällumg der Isolierung I mit 5.5g (82%). Die resultierende bessere Anreicherung mußte allerdings mit einer schlechteren Ausbeute erkauft werden. 40% der eingesetzten Enzymaktivität blieben bei der Isolierung II im Überstand der pH5-Fällung.

Bei der DEAE-Cellulose-Chromatographie führte die Erhöhung der KP-Konzentration in Puffer B_2 gegenüber B_1 zu einer besseren Anreicherung bei vergleichbarer Ausbeute. Das Enzym wurde im Phosphatgradienten eluiert und die Fraktionen mit KP-Konzentrationen zwischen 100 und 250mM vereinigt. Die für die nachfolgende Gelfiltration erwünschte Konzentrierung des Enzyms wurde bei beiden $(NH_4)_2SO_4$-Fällungen erreicht.

Mit der Gelfiltration über Sephadex G-100 wurde die höchste Anreicherung des Enzyms durch einen Einzelschritt erzielt.

Tab.1 Isolierung I einer NAD-abhängigen 15HPGDH aus Humanplacenta. Die Enzymaktivitäten basieren auf dem Standardtest (3.1.1.). 1mU entspricht der Bildung von 1nMol NADH/min (vgl. 3.1.3.). Proteinkonzentrationen wurden mit Amidoschwarz bestimmt (3.2.1.).

Enzymfraktion	Volumen (ml)	Protein		Enzymaktivität			Ausbeute (%)	Anreicherung (n-fach)
		Konzentration (mg/ml)	gesamt (mg)	Konzentration (mU/ml)	gesamt (mU)	spezifisch (mU/mg)		
17000xg-Überstand	700	9.7	6790	55	38500	5.7	(100)	(1)
pH5-Fällung	160	7.8	1250	162	25900	20.8	67	3.6
DEAE-Cellulose-Pool	755	0.57	430	25	18900	44	49	7.7
$(NH_4)_2SO_4$-Fällung	30	7.9	240	552	16600	70	43	12.3
Sephadex-G-100-Pool	155	0.09	14	82	12700	910	33	160
A-50-Pool I	32	0.07	2.2	345	11000	4930	29	865

Tab.2 Isolierung II einer NAD-abhängigen 15HPGDH aus Humanplacenta. Die Enzymaktivitäten wurden mit dem Standardtest bestimmt (3.1.1.). 1mU entspricht der Bildung von 1nMol NADH/min (vgl. 3.1.3.). Proteinkonzentrationen wurden mit Amidoschwarz ermittelt (3.2.1.). Die Phenyl-Sepharose-Chromatographie (Hauptlauf) wurde mit 22.3% des A-50-Pools II durchgeführt. Die mit * bezeichneten Werte wurden entsprechend hochgerechnet.

Enzymfraktion	Volumen (ml)	Protein		Enzymaktivität			Ausbeute (%)	Anreicherung (n-fach)
		Konzentration (mg/ml)	gesamt (mg)	Konzentration (mU/ml)	gesamt (mU)	spezifisch (mU/mg)		
17000xg-Überstand	750	8.8	6600	37	27750	4.2	(100)	(1)
pH5-Fällung	120	5.75	690	129	15500	22.4	56	5.3
DEAE-Cellulose-Pool	262	0.52	136	40	10500	77	38	18.3
$(NH_4)_2SO_4$-Fällung	25	3.75	94	363	9080	97	33	23.1
Sephadex-G-100-Pool	97	0.06	5.8	64	6210	1070	22	255
A-50-Pool II	51	0.018	0.92	74	3770	4100	14	980
Phenyl-Seph.-Pool	22*	0.003	0.07*	124	2730*	41000	10*	9760

Weitaus der größte Teil des Proteins wurde in einem hohen Peak vor dem Erscheinen der 15HPGDH-Aktivität eluiert. In Abb.5 ist der Sephadex-G-100-Lauf der Isolierung II gezeigt, der in Gegenwart von 30% Glycerin durchgeführt wurde. In 20% Glycerin (Isolierung I) ergab sich bei einer höheren Laufgeschwindigkeit ein prinzipiell gleiches Elutionsprofil mit etwas schmalerem 15HPGDH-Peak. Beim abgebildeten Säulenlauf wurden die Fraktionen zwischen 660 und 750ml Elutionsvolumen vereinigt.

Im Eluat der DEAE-Sephadex-A-50-Chromatographien, bei denen ein KCl-Gradient auf der Basis von 100mM KP verwendet wurde, fand sich die 15HPGDH-Aktivität zwischen KCl-Konzentrationen von ca. 50 und 200mM.

4.2.3. Hydrophobe Chromatographien

Die mit einem Teil des A-50-Pools II durchgeführte Octyl-Sepharose-Chromatographie führte zu keiner nennenswerten Anreicherung der 15HPGDH (Tab.3). Bei den unter 3.2.10. beschriebenen Bedingungen wurde das Enzym quantitativ gebunden. Eine Erniedrigung der Phosphatkonzentration auf null führte selbst in Gegenwart von 50% Glycerin zu keiner Elution von 15HPGDH-Aktivität. Diese erfolgte erst bei Zugabe von 0.3% Triton zum Elutionspuffer. Hierbei erschien die Enzymaktivität, nur ganz geringfügig versetzt gegenüber dem Hauptproteinpeak, mit dem ersten Triton (ab 0.01%) im Eluat.

Demgegenüber konnte bei der Phenyl-Sepharose-Chromatographie eine 10-fache Anreicherung des Enzyms erzielt werden (Hauptlauf, vgl. Tab.3). Der Phenyl-Sepharose-Hauptlauf ist in Abb.6 dargestellt. 15HPGDH wurde im Gegensatz zu einem großen Teil des Fremdproteins bei 20mM KP quantitativ gebunden und im absteigenden Phosphatgradienten ab etwa 3mM KP eluiert. Die Fraktionen 52-56 (Elutionsvolumen: 52-56ml) wurden unter Erhöhung der KP-Konzentration auf 5mM zum Phenyl-Seph.-Pool vereinigt.

In Tab.4 sind die für die folgenden Kapitel interessanten Enzymfraktionen nochmals zusammenfassend charakterisiert.

Tab.3 Hydrophobe Chromatographien mit A-50-Pool II. Folgende Enzymaktivitäten wurden eingesetzt: 250mU beim Octyl-Sepharose-Lauf, 250mU beim Phenyl-Sepharose-Probelauf und 840mU beim Phenyl-Sepharose-Hauptlauf.

Säulenchromatographie mit	Volumen (ml)	Protein ges. (µg)	Aktivität ges. (mU)	Aktivität spez. ($\frac{U}{mg}$)	Ausbeute (%)	Anreicherung (n-fach)
Octyl-Sepharose	1.4	43	213	5	85	1.2
Phenyl-Sepharose (Probelauf)	2	4	140	35	56	8.5
Phenyl-Sepharose (Hauptlauf)	5	15	620	41	73	10.0

Tab.4 Zusammenfassende Charakterisierung einiger Enzymfraktionen. Die scheinbaren Michaeliskonstanten für NAD wurden in 100mM TRAP bei pH 7.4 und 37°C mit 0.1mM PGE2 als festem Substrat bestimmt.

Enzymfraktion	spez. Aktivität (mIU/mg Prot.)	$K_m^{NAD}{}_{app}$ (µM)	nähere Charakterisierung
G-50-Pool/ 17000xg	9	54	ein über Sephadex G-50 in Puffer B2 überführter 17000 xg-Überstand
A-50-Pool D	300	44	in Puffer F1 überführter DEAE-Sephadex-A-50-Pool (Jung et al.,1975)
A-50-Pool I	5200	50	vgl. Tab.1
A-50-Pool II	4300	54	vgl. Tab.2
Phenyl-Seph.-Pool	43000	45	vgl. Tab.2 und 3

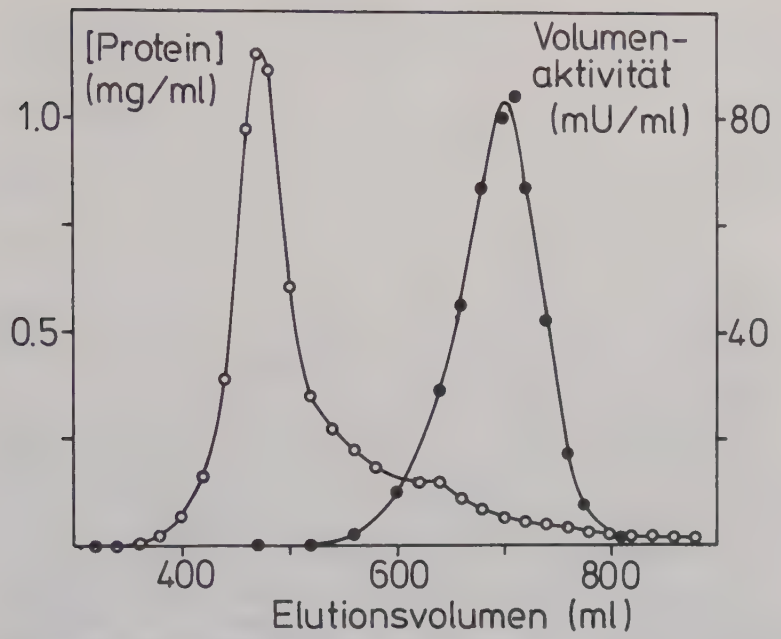

Abb.5 Sephadex-G-100-Eluat (Isolierung II). Gelvolumen: 1340ml ((3x190)cm), 0-4°C, 15ml/h, Puffer D2. o——o : Proteinkonzentration (mg/ml) durch A260/A280 nach 3.2.1. ●——● : Volumenaktivität (15HPGDH-Konzentration im Eluat, mU/ml) durch Standardtest nach 3.1.1.

Abb.6 Phenyl-Sepharose-Eluat (Hauptlauf). Gelvolumen: 1.8 ml. Die Puffer enthielten 50% Glycerin, 1mM EDTA und 0.5mM DTE und hatten pH 7.3 bei 0-4°C. x- - -x : KP-Konzentration (mM), vgl. 3.2.2.; ——— : Proteinkonzentration (µg/ml), Bestimmung mit Amidoschwarz, vgl. 3.2.1., niedrigere Proteinkonzentrationen als die gezeigten waren ohne erheblichen Aufwand nicht mit genügender Sicherheit zu bestimmen; o——o : Volumenaktivität (15HPGDH-Konzentration im Eluat, mU/ml), Standardtest, vgl. 3.1.1.

Abb.7 Schematische Skizze der analytischen Disk-Elektrophoresen von Teilen des Phenyl-Sepharose-Eluats (Hauptlauf). Durchführung in einer Flachgelapparatur mit pH8.5/7%- und pH8.5/9.8%-Gelen. 8.3% Glycerin im Sammelgel und 12.5% Glycerin im Trenngel. Die in Längsrichtung zerschnittenen Gele wurden nach 3.2.11. auf Protein oder 15HPGDH-Aktivität angefärbt. D: Proteinanfärbung der vereinigten Fraktionen 6-16 (Durchlauf); P: Proteinanfärbung des Phenyl-Seph.-Pools; A: 15HPGDH-Aktivitätsanfärbung.

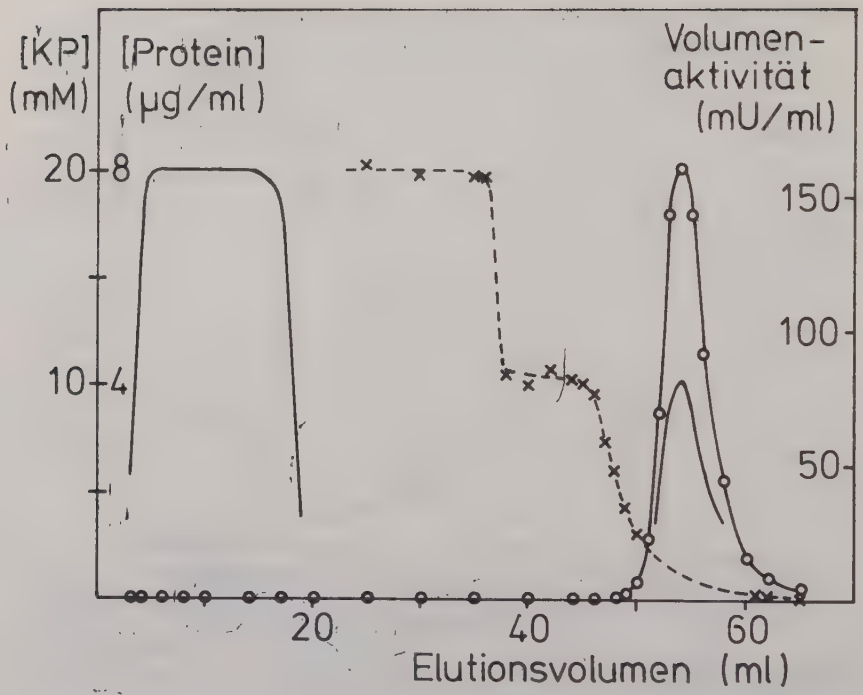
[KP]
(mM)
[Protein]
(µg/ml)
Volumen-
aktivität
(mU/ml)
20
8
10
4
150
100
50
20
40
60
Elutionsvolumen (ml)

Abb.6

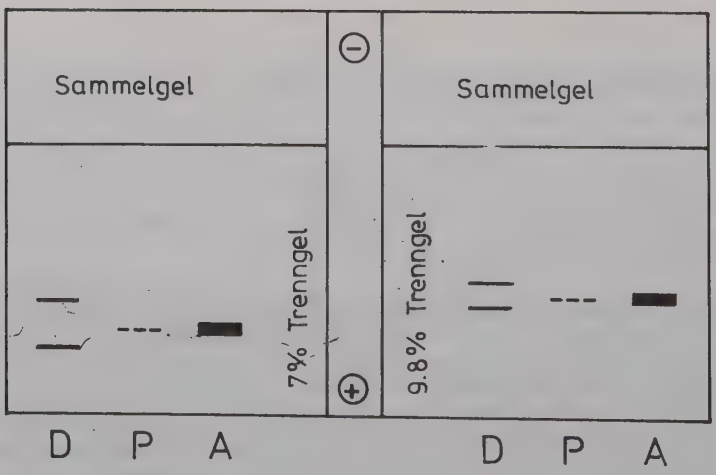
Sammelgel
Sammelgel
7% Trenngel
9.8% Trenngel
⊖
⊕
D
P
A
D
P
A

Abb.7

4.2.4. Analytische Disk-Elektrophoresen

Die analytischen Disk-Elektrophoresen der A-50-Pools I und II enthielten trotz der hohen spezifischen Aktivitäten dieser Fraktionen noch mehrere Proteinbanden, von denen allerdings einige nur sehr schwach und erst bei der Elektrophorese größerer Mengen zu sehen waren. Alle untersuchten Enzymfraktionen (A-50-Pool D, A-50-Pool I und II, Phenyl-Seph.-Pool) zeigten nur eine Bande in der Aktivitätsanfärbung, die nicht mit einer Bande in der Kontrollanfärbung (Ansatz ohne PG für "nothing dehydrogenase", vgl. Gabriel, 1971) korrespondierte. Die 15HPGDH-Anfärbung war stets wesentlich breiter als entsprechende Proteinbanden. Sie war im Vergleich zu Anfärbungen von Lactat-Dehydrogenase-Banden relativ schwach, da im Gegensatz zu Lactat-Dehydrogenase die Färbung nur an der Geloberfläche erfolgte.

Abb.7 zeigt eine schematische Skizze der analytischen Disk-Elektrophoresen der vereinigten Durchlauffraktionen des Phenyl-Sepharose-Hauptlaufs und des Phenyl-Seph.-Pools. Im Durchlauf finden sich zwei Hauptbanden des A-50-Pools II wieder. Die Proteinanfärbung des Phenyl-Seph.-Pools war wegen der geringen Proteinkonzentration nur äußerst schwach.

Versuche, 15HPGDH-Fraktionen geringer Proteinkonzentration mit trockenem Sephadex G-25 coarse einzuengen (Flodin et al.,1960), waren wenig erfolgreich. Eine Verminderung des Volumens auf die Hälfte war von einem Aktivitätsverlust um 30-40% begleitet, obwohl die verwendete Methode als sehr geeignet für labile Enzyme gilt.

4.2.5. Versuche zur Affinitätschromatographie

In einem Puffer von pH 7.3, der aus 20mM KP, 1mM EDTA, 0.5 mM DTE und 50% Glycerin bestand, band die 15HPGDH des A-50 -Pools I bzw. II bei ca. 2°C weder an eine NAD-Agarose, bei der das NAD über die Ribose an den Träger gebunden war, noch an eine NAD-Agarose, die über die C-8-Position des Adenins immobilisiertes NAD enthielt.

4.3. KONTROLLUNTERSUCHUNGEN

4.3.1. Reinheitskontrolle der Prostaglandine

Einige der bei der dünnschichtchromatographischen Reinheitskontrolle der PG, ihrer Metabolite und Analogen erhaltenen scheinbaren R_f-Werte sind in Tab.5 und 6 zusammengefaßt, um einen Eindruck der relativen Mobilitäten zu vermitteln. Es handelt sich dabei nur z.T. um Mittelwerte verschiedener Läufe. Die scheinbaren R_f-Werte werden durch Art des Kieselgels, seinen Wassergehalt (Hitzeaktivierung), Kammer- und Plattensättigung, PG-Menge etc. deutlich beeinflußt (vgl. Andersen,1969; Shaw & Ramwell,1969; Kibbey et al.,1977).

Nano-Platten SIL-20 benötigen nur kurze Laufzeiten von ca. 20min und führen zu relativ scharfen Substanzflecken. Laufmittel I, II und IV sind zur Reinheitskontrolle der PG gut geeignet, wobei I und IV etwas günstiger für die PGE- und II günstiger für die PGF-Serie ist. Zur Überprüfung auf Verunreinigungen mit gegenüber den PG höheren Mobilitäten eignet sich Laufmittel III. Anisaldehyd-Reagenz bietet den Vorteil einer unterschiedlichen Anfärbung der PG, ihrer Metabolite und Analogen (Tab.5). Allerdings konnten in einzelnen Fällen mit äthanolischer Phosphormolybdänsäure Verunreinigungen sichtbar gemacht werden, die mit Anisaldehyd-Reagenz nicht angefärbt wurden. In NH_3-Atmosphäre werden $15KPGE_1$ und $15KPGE_2$ je nach Dauer der Einwirkung gelb bis rotbraun, PGD_2 und sein enzymatisches Produkt gelb angefärbt.

4.3.2. Überprüfung der Produkte der enzymatischen Reaktion

Die 15HPGDH-Reaktion (A-50-Pool I) von PGE_1 bzw. $PGF_{2\alpha}$ mit NAD führte zu einem Produkt, daß in Laufmittel I auf hitzeaktivierten DC-Karten SI mit dem entsprechenden 15KPG cochromatographierte und in Kontrollansätzen von $PGF_{2\alpha}$ und NAD ohne Enzym nicht auftauchte. In entsprechender Weise wurde ein enzymatisches Produkt der $15KPGE_1$/NADH-Reaktion erhalten, das sich dünnschichtchromatographisch wie PGE_1

Tab.5 Scheinbare R_f-Werte verschiedener PG und ihre Farbe mit Anisaldehyd-Reagenz auf hitzeaktivierten (110°C, 2h) Kieselgelplatten DC-Karten SI. Einzelheiten siehe 3.3.1.

	Scheinbare R_f mit Laufmittel			Farbe mit Anisaldehyd-Reagenz
	I	III	IV	
PGE_1	0.38	0.05	0.26	rotbraun
$15KPGE_1$	0.48	0.20	0.51	rotbraun
$15K13,14DPGE_1$	0.50	0.22	0.58	gelb
PGE_2	0.34			braun
$PGF_{1\alpha}$	0.23			grau
$PGF_{2\alpha}$	0.23	0.02		grau
$15KPGF_{2\alpha}$	0.32			gelbbraun
$15K13,14DPGF_{2\alpha}$	0.36			
PGA_1	0.53	0.26	0.69	braun
PGB_1	0.54	0.24		ziegelrot
PGD_2	0.47	0.14		braunrot
U-44069	0.56	0.25		violett
U-46619	0.55	0.23		grauviolett
ICI 86,384	0.25			

Tab.6 Scheinbare R_f-Werte verschiedener PG auf Nano-Platten SIL-20 (Kieselgel). Einzelheiten siehe 3.3.1.

	Scheinbare R_f mit Laufmittel	
	I	II
PGE_2	0.59	0.36
15-Methyl-PGE_2	0.65	0.40
$15KPGE_2$	0.80	0.61
$PGF_{2\alpha}$	0.45	0.25
15-Methyl-$PGF_{2\alpha}$	0.55	0.33
TXB_2	0.67	0.46
PGB_1		0.72
ICI 86,384		0.26
ICI 87,907		0.23

verhielt. In beiden Fällen konnte kein 15K13,14DPG nachgewiesen werden. Im Fall von PGE_1, wo die Auftrennung der beiden Metabolite in Laufmittel I ungenügend ist (Tab.5), kann eine Unterscheidung von 15KPGE und 15K13,14DPGE, außer durch Anisaldehyd-Reagenz (Tab.5) auch in NH_3-Atmosphäre erfolgen. Hier färbt sich nur 15KPGE rotbraun. Eine nachfolgende Behandlung mit äthanolischer Phosphormolybdänsäure führt zu einem mischfarbigen 15KPGE-Fleck und einem reinblauen 15K13,14DPGE-Bereich.

Besser als Laufmittel I eignet sich zur Trennung der PGE und ihrer Metabolite das von Baier (1977) speziell hierfür entwickelte Laufmittel IV. Neben der recht guten Trennung der beiden Metabolite voneinander erlaubt es ihre klare Unterscheidung von PGA (Tab.5), das bei der nichtenzymatischen Dehydratisierung von PGE entstehen kann (Hajratwala,1975; Shaw & Ramwell,1969). Die in diesem Abschnitt beschriebenen Ergebnisse wurden vor der Einführung von Laufmittel IV in unserem Laboratorium erhalten.

Die enzymatische Reaktion (A-50-Pool I) von PGA_1 und PGD_2 führte zu je einem Produkt mit höherem R_f-Wert, das in Kontrollansätzen ohne Enzym nicht auftrat. Zur dünnschichtchromatographischen Identifizierung standen hier keine Metabolite als Referenzen zur Verfügung.

4.3.3. UV-VIS-Spektren

Das Spektrum der 15HPGDH aus Humanplacenta zeigte ein hohes Maximum bei 280nm und bei höheren Wellenlängen keine weitere Absorption. Triton wies in Puffer I_2 (3.2.3.) ein Absorptionsmaximum von ca. 276nm auf. In 100mM TRAP, 0.5mM DTE, 30% Glycerin (pH 7.4) hatten Cytochrom c und Myoglobin u.a. ein Absorptionsmaximum bei 416nm. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit PGD_2 sind an anderer Stelle zusammengefaßt (4.5.2.).

4.3.4. Fremdaktivitäten in Enzymfraktionen

Schon in den 17000xg-Überständen von Humanplacentahomogenaten konnte keine Alkohol-Dehydrogenase festgestellt

werden. Lactat-Dehydrogenase-Aktivität, die sich noch in den $(NH_4)_2SO_4$-Fällungen befand, wurden nicht gefunden in A-50-Pool I und II nach Bergmeyer (1970) und in der Peak-Fraktion von A-50-Pool D durch Aktivitätsanfärbung nach Disk-Elektrophorese (Jung et al.,1975). Auf 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase wurde nur der A-50-Pool II und der Phenyl-Seph.-Pool überprüft und mit beiden in 3.3.4. erwähnten Tests keine Aktivität gefunden.

NAD-Reduktase- und NADH-Oxidase-Aktivität konnte unter Standardtestbedingungen in keinem der drei A-50-Pools gemessen werden und sollte damit auch nicht im Phenyl-Seph.-Pool auftreten. Dasselbe gilt für einen enzymatischen Umsatz von PG oder 15KPG mit einer Absorptionsveränderung bei 340nm.

Eine scheinbare NADP-abhängige 15HPGDH-Aktivität konnte unter Standardtestbedingungen bis zur $(NH_4)_2SO_4$-Fällung (einschließlich) verfolgt werden. Nach Baier (1977) wird sie durch die Umwandlung von NADP in NAD während der Vorinkubation hervorgerufen. Die gereinigte NAD-abhängige 15HPGDH aus Humanplacenta ist frei von NADP-abhängiger Aktivität: der von A-50-Pool I und II katalysierte Umsatz mit 2mM NADP und 0.1mM PGE_2, der 0.8-1% der entsprechenden Reaktion mit NAD entspricht, beruht auf der vom Hersteller angegebenen Verunreinigung von NADP mit 0.02 Molprozent NAD.

Eine mit den unter 3.3.4. beschriebenen Tests nachweisbare NADH-abhängige PGE-9-Keto-Reduktase fand sich weder in den untersuchten 17000xg-Überständen noch im A-50-Pool II.

4.4. UNTERSUCHUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG EINER 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE

4.4.1. Molekulargewicht durch Gelfiltration

Für die hochangereicherte 15HPGDH aus Humanplacenta wurde unter den in 3.4.1. beschriebenen Bedingungen durch Gelfiltration über Sephadex G-100 ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 52000 ermittelt (Abb.8). Die Abschätzung des Stoke Radius des nativen Enzyms ergab $32x10^{-8}$cm.

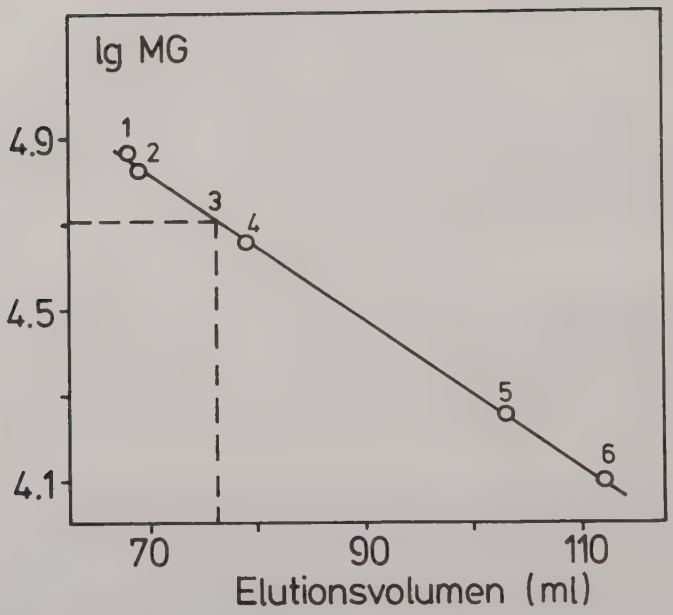

Abb.8 Molekulargewichtsbestimmung der 15HPGDH durch Gelfiltration über Sephadex G-100. Säulenabmessungen: (1.4 x 96)cm; Säulenpuffer: 100mM TRAP, 1mM DTE, 30% Glycerin, pH 7.4; Temperatur: 0-4°C; Laufgeschwindigkeit: 5ml/h. 140mIU A-50-Pool I (3) wurden aufgetragen. Eichproteine: Alkalische Phophatase aus E.coli (1), Rinderserumalbumin (2), Ovalbumin (4), Myoglobin (5) und Cytochrom c (6).

Tab.7 Stabilisierung der 15HPGDH durch NAD. Proben einer pH5-Fällung wurden bei 4°C und pH 7.4 in 20mM KP, 0.4mM EDTA, 0.2mM DTE und 20% Glycerin in Gegenwart der angegebenen NAD-Konzentration aufbewahrt.

NAD-Konzentration in der Enzymlösung (mM)		0	0.4	1	2	4
Aktivität in % der Ausgangsaktivität nach	- 1 Tag	100	102	100	97	100
	- 8 Tagen	76	96	94	94	95
	- 16 Tagen	36	85	82	85	82

4.4.2. Stabilität und Stabilisierung des Enzyms

Bei 2-4°C in 20% Glycerin trat innerhalb von zwei Wochen ein deutlicher Aktivitätsverlust auf, der je nach Enzymfraktion und sonstigen Bedingungen zwischen 18 und 69% lag. Unter diesen Bedingungen konnte eine Stabilisierung durch Aufbewahrung als Fällung in Gegenwart von 60% Ammoniumsulfat erreicht werden. Ebenso führte hier NAD zu einer deutlichen Stabilisierung des Enzyms, die zwischen 0.4 und 4mM NAD unabhängig von der NAD-Konzentration war (Tab.7). Weitere Untersuchungen zur Stabilisierung wurden bereits in der vorangehenden Diplomarbeit (Rückrich,1974) vorgelegt.

In 50% Glycerin bei -20°C (20mM KP, 1mM EDTA, pH 7.4, 10mM ME bzw. 0.5mM DTE) war der A-50-Pool D (0.47mg Protein/ml) ein Jahr ohne meßbaren Aktivitätsverlust haltbar. Demgegenüber verloren unter diesen Bedingungen innerhalb eines Jahres der A-50-Pool I (0.07mg Protein/ml) 35% und innerhalb eines halben Jahres der A-50-Pool II (0.018mg Protein /ml) 20% sowie der Phenyl-Seph.-Pool (0.003mg Protein/ml) 33% ihrer Aktivität.

4.4.3. Einfluß von Puffern und Salzen auf die enzymatische Aktivität

Systematische Untersuchungen des konzentrationsabhängigen Einflusses verschiedener Puffer und Salze auf die 15HPGDH-Aktivität bei pH 7.4 und 37°C sind in Abb.9 dargestellt. Es fällt auf, daß im Ionenstärkebereich zwischen 0.02 und 0.08M vergleichbare Reaktionsgeschwindigkeiten erreicht werden. Bei höheren Ionenstärken treten allerdings deutliche Unterschiede auf. So hemmen HEPES, ein "Good-Puffer" (Good & Izawa,1972), der eine Sulfonatgruppe trägt, und bei noch höheren Konzentrationen auch Ammoniumsulfat und KP, die enzymatische Reaktion. TRAP, NaCl und KCl bewirken bei steigender Konzentration einen leichten Anstieg der Aktivität, der bei ca. 0.3M in Plateaus mit vergleichbarer Höhe übergeht. TRIS/HCl und Ammoniumchlorid führen bei höheren Konzentrationen zu einer Erhöhung der Anfangsgeschwindigkeit, die bei 600mM Ammoniumchlorid ca. 70% be-

trägt. Ein Vergleich beider mit TRAP zeigt einen zunehmenden Effekt vom terziären über das primäre Amin zum Ammoniumion.

4.4.4. pH-Abhängigkeit

Die direkte Messung des pH im Testansatz oder einem Vergleichsansatz bei Testtemperatur ermöglichte die Verwendung nur eines Puffers auch außerhalb seines eigentlichen Pufferbereichs zur Erstellung einer pH-Kurve. Die pH-Abhängigkeit der 15HPGDH-Hinreaktion in 100mM TRAP bei 37°C zeigte bei Vorinkubation des Enzyms mit 1mM NAD und Starten der Reaktion durch 0.05mM PGE_2 (Abb.10) bzw. 0.5mM $PGF_{2\alpha}$ (Abb.11) einen prinzipiell gleichen Verlauf. Ein Plateau zwischen pH 6.9 und pH 7.7 sowie ein hohes Maximum bei pH 9.5 (PGE_2) bzw. pH 9.3 ($PGF_{2\alpha}$) fallen auf. In beiden Fällen konnte sowohl bei pH 7.4 als auch beim pH des Peaks weder eine Spontanreaktion zwischen NAD und PG noch eine NAD-Reduktase- bzw. NADH-Oxidase-Aktivität festgestellt werden. Die Inkubation von 72µM 15KPGE$_1$ in 100mM TRAP bei pH 9.5 führte bei 340nm zu einer zeitabhängigen Extinktionszunahme, die jedoch nur ca. 1% der bei diesem pH gemessenen enzymatischen Aktivität betrug. Wurde die Reaktion mit Enzym an Stelle von $PGF_{2\alpha}$ gestartet (Abb.11, Symbol x), so waren die Aktivitäten zwischen pH 7.4 und 9.3 im Rahmen des Meßfehlers denen gleich, die unter Vorinkubation des Enzyms gemessen wurden, während der Peak zu höheren pH-Werten verschoben war.

Für Messungen im pH-Maximum, wie z.B. zur Ermittlung der mIU bei 25°C (vgl. 3.1.2., 4.1.), eignet sich wegen seiner hier höheren Pufferkapazität Gly/KOH besser als TRAP (Good & Izawa,1972). Die Lage des pH-Maximums ist auch mit diesem Puffer stark von den sonstigen Bedingungen abhängig (Abb. 12). Nicht gezeigte - in 500mM Gly/KOH bei 37°C mit 0.05mM PGE_2 gestartete - Messungen lagen im Bereich der x—x-Kurve aus Abb.12. Mit 100mM Gly/KOH ist die Enzymaktivität im pH-Maximum unter sonst gleichen Bedingungen ebenso hoch wie mit 100mM TRAP (Abb.11,12). Wurde der A-50-Pool II bei

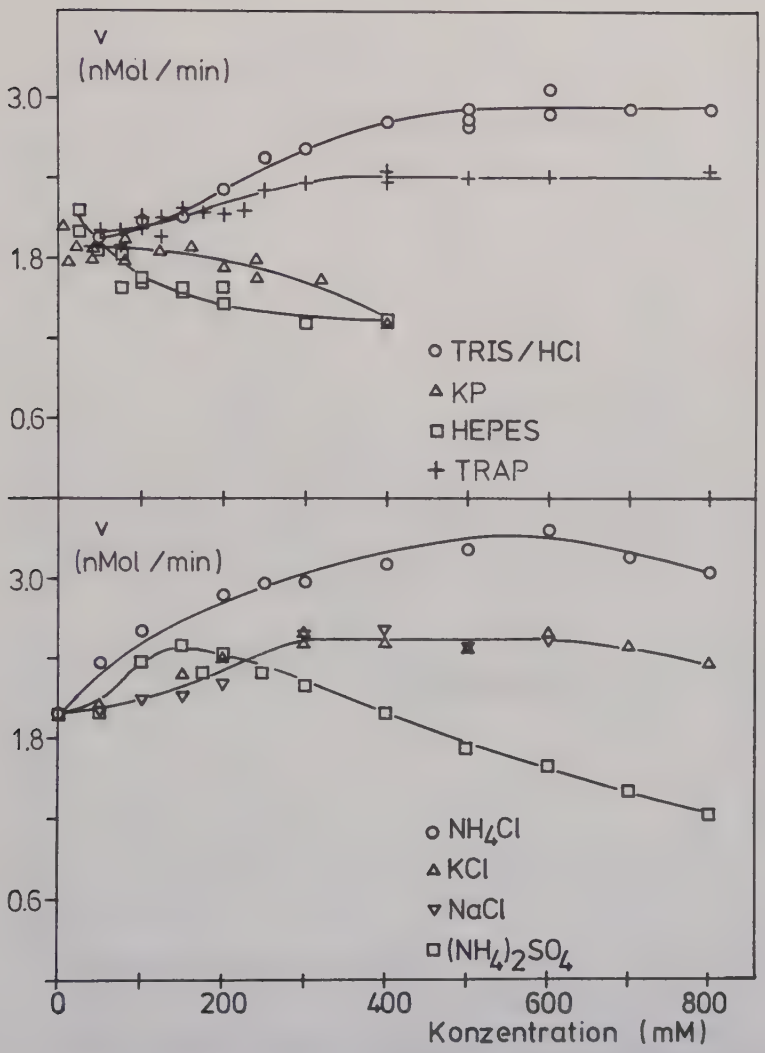

Abb.9 Abhängigkeit der 15HPGDH-Reaktion von der Konzentration verschiedener Puffer und Salze. Testbdgn.: 1mM NAD, 0.05mM PGE2, pH 7.4, 37°C, 0.5% Äthanol, 1.5 % Glycerin, A-50-Pool D als Enzymlösung. Die Messung der Salzabhängigkeiten erfolgte in Gegenwart von 50mM TRAP.

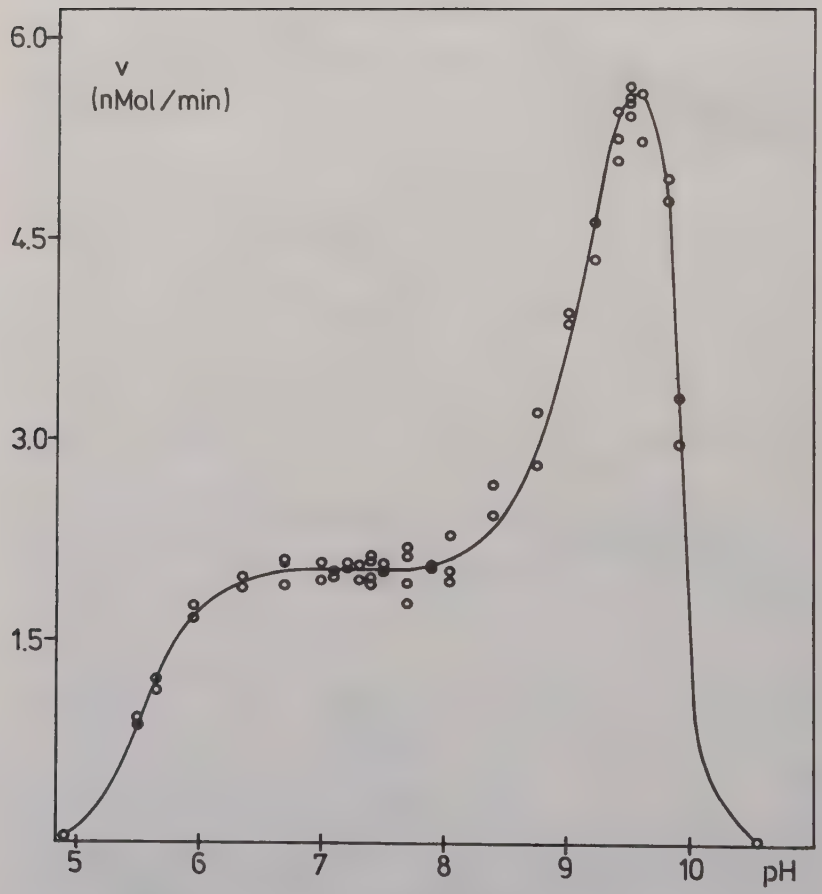

Abb.10 pH-Abhängigkeit der 15HPGDH-Hinreaktion in 100mM TRAP mit 0.05mM PGE2. Testbdgn.: 1mM NAD, 37°C, 0.5% Äthanol, 1.5% Glycerin, A-50-Pool D als Enzymlösung, 7.5µg Protein/ml. Der pH-Wert wurde direkt im Testansatz oder in einem Vergleichsansatz bei 37°C gemessen, wobei der Temperaturgang der Eichpuffer berücksichtigt wurde.

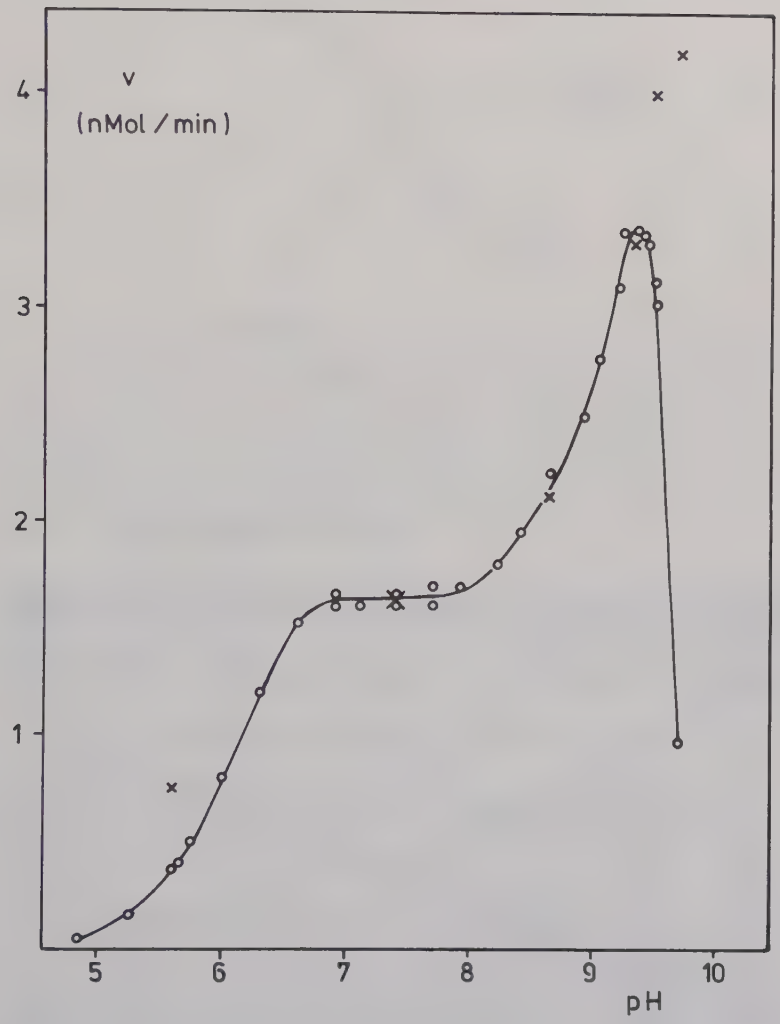

Abb.11 pH-Abhängigkeit der 15HPGDH-Hinreaktion in 100mM TRAP mit 0.5mM PGF2α. Testbdgn.: 1mM NAD, 37°C, 1.1% Glycerin, A-50-Pool II als Enzymlösung, 0.5µg Protein/ml. Die mit x bezeichneten Messungen wurden mit Enzym anstatt PG gestartet! Ansonsten vgl. Legende zu Abb.10.

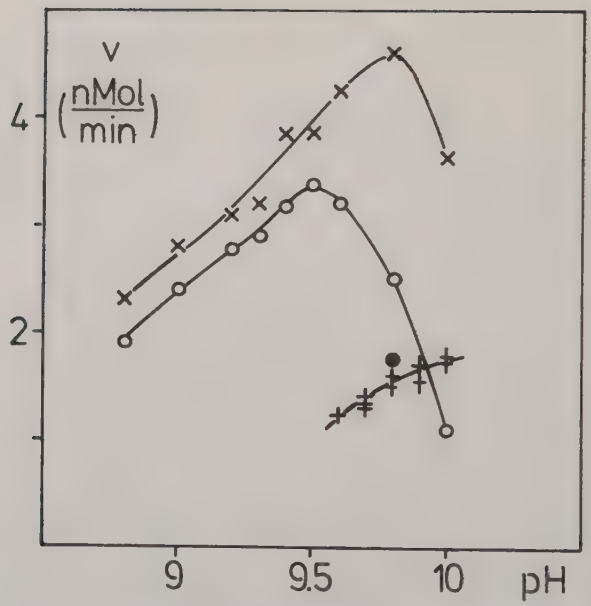

Abb.12 pH-Abhängigkeit der 15HPGDH-Hinreaktion in Gly/KOH bei hohen pH-Werten. x—x (Start mit Enzym und o—o (Start mit PG): 37°C, 1mM NAD, 0.5mM PGF2α, 1.5% Glycerin, A-50-Pool II. +—+ (500mM Gly/KOH) und • (100mM Gly/KOH): 25°C, 2mM NAD, 1% Glycerin, A-50-Pool I, Start mit PGE2 (0.05mM).

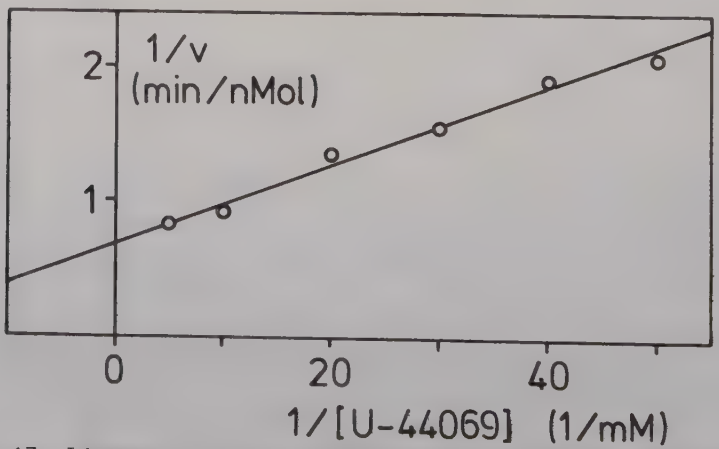

Abb.13 Lineweaver-Burk-Diagramm für U-44069 als Substrat der Hinreaktion bei pH 9.5 in 250mM Gly/KOH. Testbdgn.: 37°C, 2mM NAD, 1% Glycerin, A-50-Pool I; Start mit U-44069 (0.02-0.2mM).

37°C mit 250mM Gly/KOH und 2mM NAD vorinkubiert und die Reaktion mit dem PG-Endoperoxid-Analogen U-44069 (0.1mM) gestartet, so konnten zwischen pH 9.3 und 9.7 im Rahmen des Meßfehlers keine Aktivitätsunterschiede festgestellt werden. Das Lineweaver-Burk-Diagramm für U-44069 (0.02-0.2mM) bei pH 9.5 in 250mM Gly/KOH war linear (Abb.13). Die so ermittelte scheinbare Michaeliskonstante für U-44069 war mit 43µM ca. doppelt so hoch wie die bei pH 7.4 in 100mM TRAP erhaltene. Die Maximalgeschwindigkeit lag um 44% höher als bei pH 7.4.

Die pH-Abhängigkeit der 15HPGDH-Rückreaktion in 100mM TRAP bei 37°C zeigte zwischen pH 5.9 und pH 9.2 eine kontinuierliche Verminderung der Aktivität, die bei pH 9.2 gegen null ging (Abb.14). Zwischen 15KPGE$_1$ und NADH wurde bei pH 7.4 und 5.9 keine Spontanreaktion beobachtet.

4.4.5. Temperaturabhängigkeit

Zwischen dem dekadischen Logarithmus der Anfangsgeschwindigkeit der 15HPGDH-Hinreaktion und der reziproken Temperatur besteht im Bereich von 20°C bis 37°C in 100mM TRAP bei pH 7.4 eine lineare Beziehung (Abb.15). Aus der erhaltenen Geraden errechnet sich, wie unter 3.4.3. beschrieben, für die Substrate NAD und PGE$_2$ mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung eine Aktivierungsenergie (E_A) von 13.6 kcal/Mol. Im verwendeten Temperaturbereich entspricht dies einer molaren Aktivierungsenthalpie von ca. 13 kcal/Mol.

4.4.6. Äthanol und Glycerin als Inhibitoren

Äthanol, das eventuell über die PG-Lösungen in den Testansatz gelangt, und Glycerin, ein Bestandteil der Enzymlösungen, üben innerhalb des in Abb.16 bzw. 17 angezeigten Konzentrationsbereichs eine im Rahmen des Meßfehlers lineare Hemmung aus. Die Glycerinhemmung scheint, soweit eine Aussage auf der Basis der geringen Anzahl von Meßpunkten möglich ist, unkompetitiv gegenüber PG zu sein. Sie liegt bei der höchsten eingesetzten Glycerinkonzentration von 2.5% zwischen 7 und 9% (0.02 bzw. 0.1mM PGE$_1$).

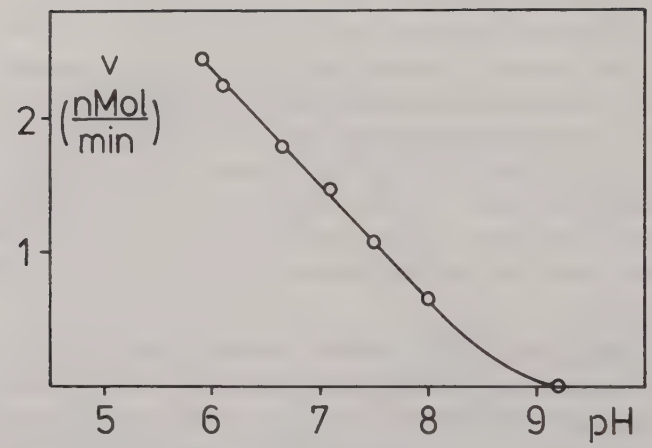

Abb.14 pH-Abhängigkeit der 15HPGDH-Rückreaktion in 100mM TRAP. Testbedgn.: 0.05mM NADH, 0.5mM 15KPGE1, 37°C, 1% Äthanol, 0.5% Glycerin, A-50-Pool I. Ansonsten vgl. Legende zu Abb.10.

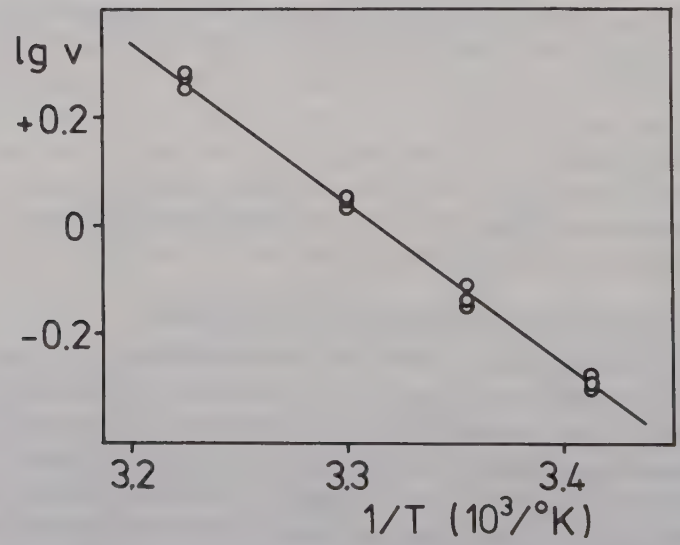

Abb.15 Temperaturabhängigkeit der Hinreaktion (Arrhenius-Diagramm). Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4 (bei allen Temperaturen), 1mM NAD, 0.05mM PGE2, 0.5% Äthanol, 1.5% Glycerin, A-50-Pool D. v in (nMol/min).

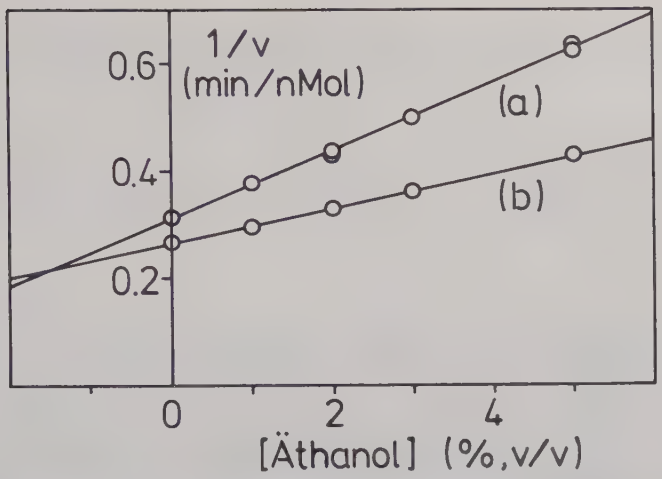

Abb.16 Dixon-Diagramm der Äthanolhemmung. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 37°C, 1mM NAD, 0.02 (a) bzw. 0.1 (b) mM PGE1, 2.5% Glycerin, A-50-Pool D. 0-5% (v/v) Äthanol wurden mit vorinkubiert.

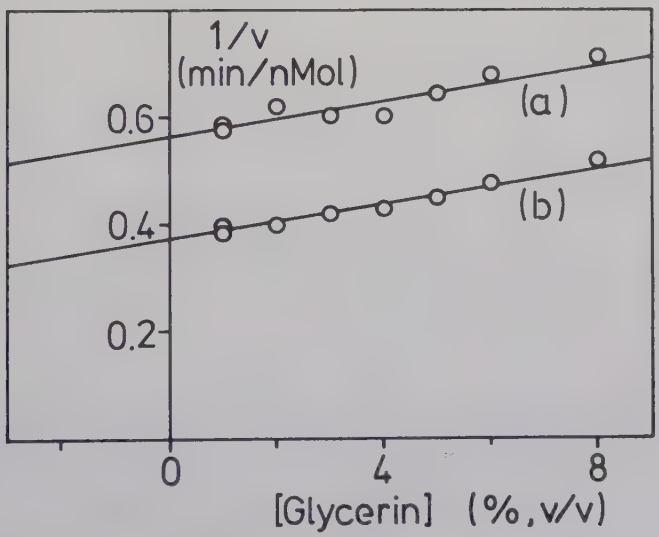

Abb.17 Dixon-Diagramm der Glycerinhemmung. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 37°C, 1mM NAD, 0.02 (a) bzw. 0.1 (b)mM PGE1. 0-8% Glycerin wurden mit vorinkubiert.

Das Dixon-Diagramm der Äthanolhemmung (Abb.16) erlaubt keine Aussage über den Hemmtyp. Trägt man 1/v gegen $1/[PGE_1]$ auf (nicht gezeigt), so ergibt sich, unter der gleichen Einschränkung wie oben, eine nichtkompetitive Hemmung nach der Definition von Cleland (1970). Die Hemmung beträgt bei 1% Äthanol, der höchsten in Ausnahmefällen für andere Messungen verwendeten Konzentration, ca. 11% (0.1mM PGE_1) bzw. 17% (0.02mM PGE_1).

4.4.7. Einfluß von Detergenzien, Lipiden und anderen Substanzen auf die enzymatische Aktivität

Wie aus Tab.8 hervorgeht, führen 0.1% der nichtionischen Detergenzien Triton X-100 und Brij 56 in 100mM TRAP bei pH 7.4, 37°C und quasisättigenden Substratkonzentrationen zu einer 69%igen bzw. 40%igen Erhöhung der Anfangsgeschwindigkeit der 15HPGDH-Reaktion. Die gleiche Konzentration des ionischen Detergenz SDS bewirkt eine vollständige Inaktivierung des Enzyms (5min Vorinkubation!). Eine signifikante Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgt auch durch die Membranlipide "Gangliosidgemisch aus Rinderhirn" und Lecithin. Letzteres konnte wegen seiner geringen Löslichkeit nicht in höheren Konzentrationen eingesetzt werden. 17ß-Östradiol und cis-Androsteron hemmen unter diesen Bedingungen nur sehr schwach.

In 400mM TRAP bei pH 7.4 und 25°C mit 2mM NAD und 0.05mM PGE_2 bewirkten 1% Triton X-100 (v/v) eine 36%ige und 0.25 bzw. 1% (w/v) Brij 58 eine 15 bzw. 14%ige "Aktivierung". 15HPGDH (4800mIU/mg Protein, 0.05mg Protein/ml, 2mM KP, 1mM EDTA, 0.5mM DTE, 50% Glycerin) konnte in Gegenwart von 0.04% Triton X-100 ein halbes Jahr ohne Aktivitätsverlust bei -20°C aufbewahrt werden. Zum Austesten wurden immer 25µl Enzymlösung eingesetzt, was einer Triton-Konzentration i.T. von 0.001% entspricht. Wurde die Triton-Konzentration i.T. auf 0.1% erhöht, so ergab sich mit dieser Enzymfraktion nur eine 12%ige "Aktivierung".

Unter den in der Legende zu Abb.18a angegebenen Bedingungen tritt eine signifikante "Aktivierung" ab 0.004% Triton auf.

Tab.8 Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Detergenzien und Lipide. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 37°C, 2mM NAD, 0.1mM PGE2, A-50-Pool II.

Zusatz	Konzentration i.T. (%,w/v)	(µM)	Reaktionsgeschwindigkeit in % der unbeeinflußten Aktivität
Triton X-100	0.1		169
Brij 56	0.1		140
SDS	0.1	3470	0
Gangliosidgemisch aus Rinderhirn (SERVA)	0.1 0.05 0.02		124 134 121
L-α-Lecithin (dipalmitoyl)	0.00125 0.00025	16 3	117 107
17ß-Östradiol	0.0014	50	89
cis-Androsteron	0.0015	50	90

Tab.9 Beeinflussung kinetischer Konstanten durch Triton X-100. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 37°C, Phenyl-Seph.-Pool.

Triton-konzentration (%,v/v)	0.1mM NAD (fest)		0.2mM $PGF_{2\alpha}$ (fest)	
	$V_{max}^{PGF2\alpha}$ (%)	$K_m^{PGF2\alpha}{}_{app}$ (µM)	V_{max}^{NAD} (%)	$K_m^{NAD}{}_{app}$ (µM)
0	100	76	100	79
0.1	134	125	195	210

Abb.18 Einfluß von Triton X-100 auf die 15HPGDH-Reaktion in 100mM TRAP bei pH 7.4 und 37°C. (a): Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (v) vom dekadischen Logarithmus (lg) der Tritonkonzentration. Testbdgn.: 2mM NAD, 0.2mM PGF2α, A-50-Pool II, 0.5µg Protein/ml; 0-2.5% Triton. (b): Lineweaver-Burk-Diagramm für PGF2α in Gegenwart von 0.1% (v/v) Triton. Testbdgn.: 0.1mM NAD, 0.025-4mM PGF2α, Phenyl-Seph.-Pool, 0.2µg Protein/ml. (c): Lineweaver-Burk-Diagramm für NAD in Gegenwart von 0.1% (v/v) Triton. Testbdgn.: 0.2mM PGF2α, 0.025-2mM NAD, Phenyl-Seph.-Pool, 0.2µg Protein/ml.

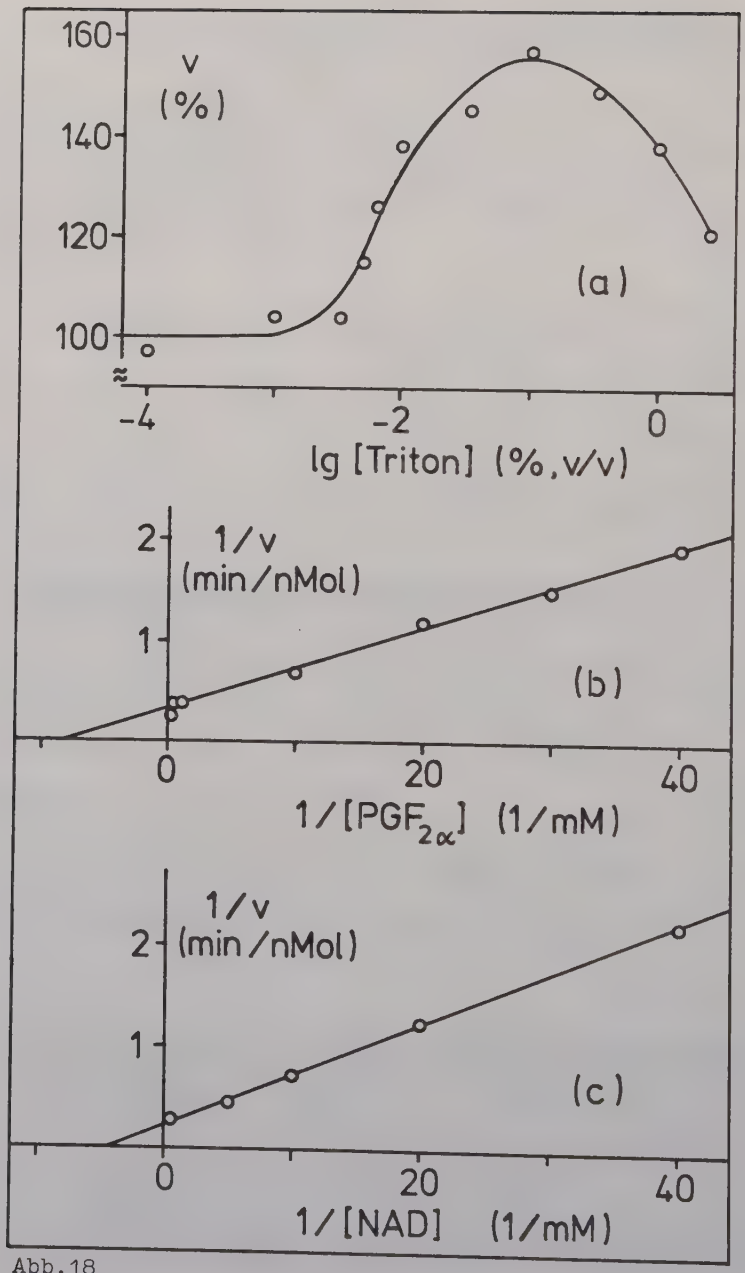
160
140
120
100
v
(%)
(a)
-4
-2
0
lg [Triton] (%, v/v)
2
1
1/v
(min/nMol)
(b)
0
20
40
1/[PGF2α] (1/mM)
2
1
1/v
(min/nMol)
(c)
0
20
40
1/[NAD] (1/mM)

Abb. 18

Die Konzentration der halbmaximalen "Aktivierung" liegt bei 0.008% und das Maximum bei 0.1%. Die Lineweaver-Burk-Diagramme für $PGF_{2\alpha}$ (Abb.18b) und NAD (Abb.18c) sind auch in Gegenwart von 0.1% Triton linear. Der Tritonzusatz führt zu einer Erhöhung der scheinbaren Michaeliskonstanten und Maximalgeschwindigkeiten (Tab.9). Dies entspricht einer "Aktivierung" bei hohen Konzentrationen beider Substrate und einer "Hemmung" der enzymatischen Reaktion bei niedrigen Substratkonzentrationen. Der Bereich, in dem keine Beeinflussung stattfindet, liegt in etwa bei den $K_m$app der unbeeinflußten Reaktion.

Folgende Substanzen hatten in 100mM TRAP bei pH 7.4 mit 0.1mM NAD und 0.1mM $PGF_{2\alpha}$ keinen signifikanten Einfluß auf die 15HPGDH-Reaktion: Methergin^R (Methylergobasinhydrogenmaleinat, 0.02mg/ml), Syntocinon^R (vollsynthetisches Oxytocin, 0.3I.E.), Harnstoff (200mM), L-Adrenalin (0.8-10mM) und DL-4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure. Homovanillinsäure führte in der hohen Konzentration von 10mM nur zu einer 16%igen Verminderung der Anfangsgeschwindigkeit.

Unter sonst gleichen Bedingungen hatte 0.01mM 4-α-Phorbol in Gegenwart von 0.05mM NAD und 0.01mM PGE_2 keinen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit, während 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat in der Konzentration von 10^{-4}mM zu einer 5%igen und in den Konzentrationen von 0.001 und 0.01mM zu einer 11%igen Hemmung führte.

Carbenoxalon, eine entzündungshemmende Verbindung mit ulkusheilender Wirkung, zeigt eine deutliche Hemmung der 15HPGDH-Reaktion (Tab.10), die im Dixon-Diagramm nicht linear ist (nicht gezeigt). Die Carbenoxalonkonzentration,

Tab.10 Hemmung durch Carbenoxalon. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 37°C, 0.1mM NAD, 0.1mM PGF2α, A-50-Pool I.

Carbenoxalonkonzentration i.T. (mM)	0.1	0.2	0.3	0.5
Reaktionsgeschwindigkeit in % der unbeeinflußten Aktivität	62	36	23	10

die unter den in Tab.10 angegebenen Bedingungen zu einer 50%igen Hemmung führt, beträgt ca. 0.14mM.

4.5. STEADY-STATE-UNTERSUCHUNGEN DER HINREAKTION EINER 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE

4.5.1. Prostaglandine und Endoperoxidanaloge als Substrate

Die Primärdiagramme der NAD/PG-Kreuzserien (Abb.19-28), die durch Analyse der Datensätze mit Hilfe eines Computerprogramms erhalten wurden, sind innerhalb der Meßgenauigkeit linear und haben alle Schnittpunkte im zweiten Quadranten. Aus den Abbildungen geht hervor, daß die scheinbaren Michaeliskonstanten aller untersuchten Substrate je nach der eingesetzten festen Konzentration des anderen Substrats verschieden sind.

In Tab.11 sind die mit ihren Standardabweichungen durch gewichtete lineare Regressionsanalyse erhaltenen relativen

Abb.19-28 Anfangsgeschwindigkeitsmuster der 15HPGDH-Hinreaktion für NAD und verschiedene PG als Substrate. Die vollständigen Datensätze wurden durch gewichtete lineare Regressionsanalyse mittels eines CDC 3300-Computers in Fortran ausgewertet. In die beiden doppelt reziproken Primärdiagramme wurden vom Computer die optimalen Geraden gezeichnet. A ≙ NAD-Konzentration (mM), B ≙ PG-Konzentration (mM), v ≙ Anfangsgeschwindigkeit (nMol/min). Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 37°C. NAD wurde zwischen 0.025(0.023) und 0.5(0.46)mM variiert (die Konzentrationen in Klammern gelten für Abb.20,24). Die verschiedenen Meßserien unterscheiden sich voneinander im wesentlichen wie folgt.

Abb.	eingesetzte Enzymfraktion	PG(minimale-maximale PG-Konz.,mM)	Glycerinkonz. (%)
19	A-50-Pool D	PGF2α (0.02-0.5)	2.5
20	A-50-Pool I	PGF2α (0.025-0.5)	1.0
21	A-50-Pool I	PGF2α (0.024-0.48)	1.0
22	Phenyl-Seph.-Pool	PGF2α (0.025-0.5)	2.5
23	A-50-Pool D	PGE2 (0.005-0.1)	2.5
24	A-50-Pool I	PGE2 (0.0063-0.1)	1.0
25	A-50-Pool I	U-44069 (0.025-0.2)	1.0
26	A-50-Pool I	U-46619 (0.025-0.25)	1.0
27	A-50-Pool D	PGE1 (0.01-0.1)	2.5
28	A-50-Pool I	PGA1 (0.008-0.08)	1.0

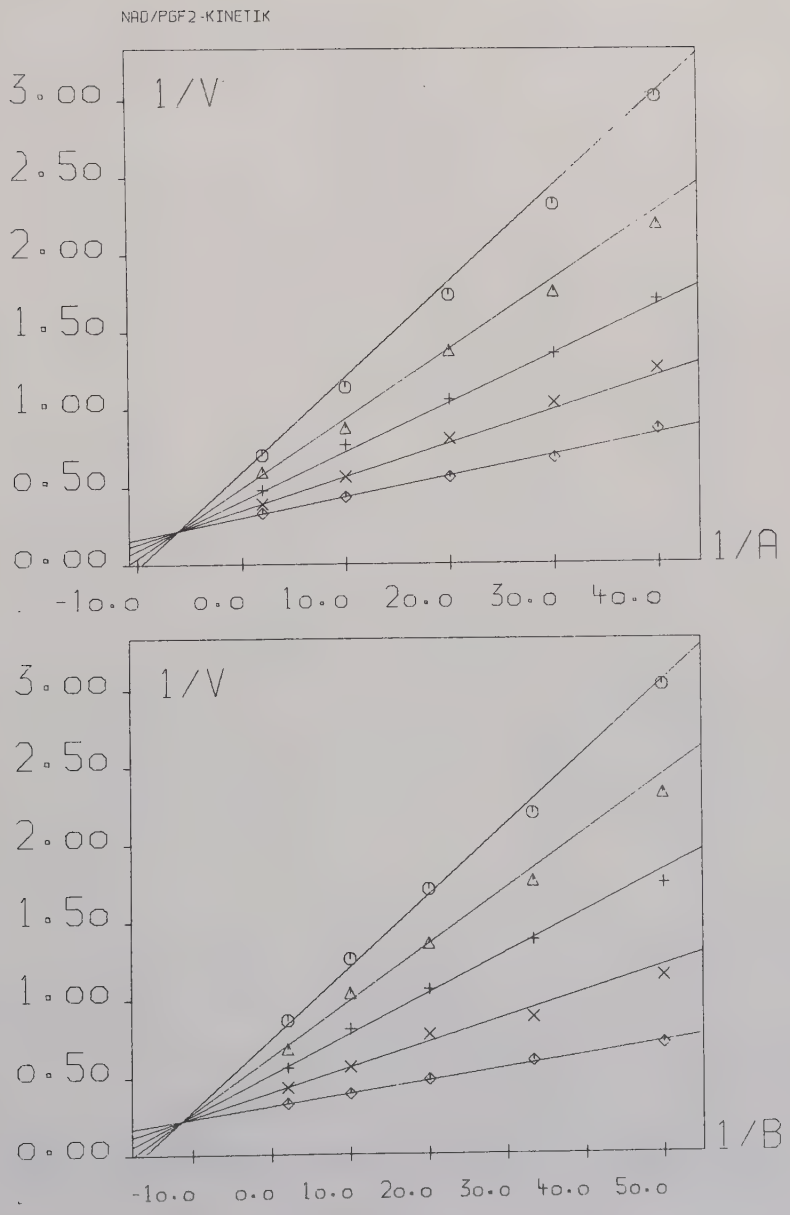
NAD/PGF2-KINETIK
1/V
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
1/A
-10.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
1/V
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
1/B
-10.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0

Abb.19

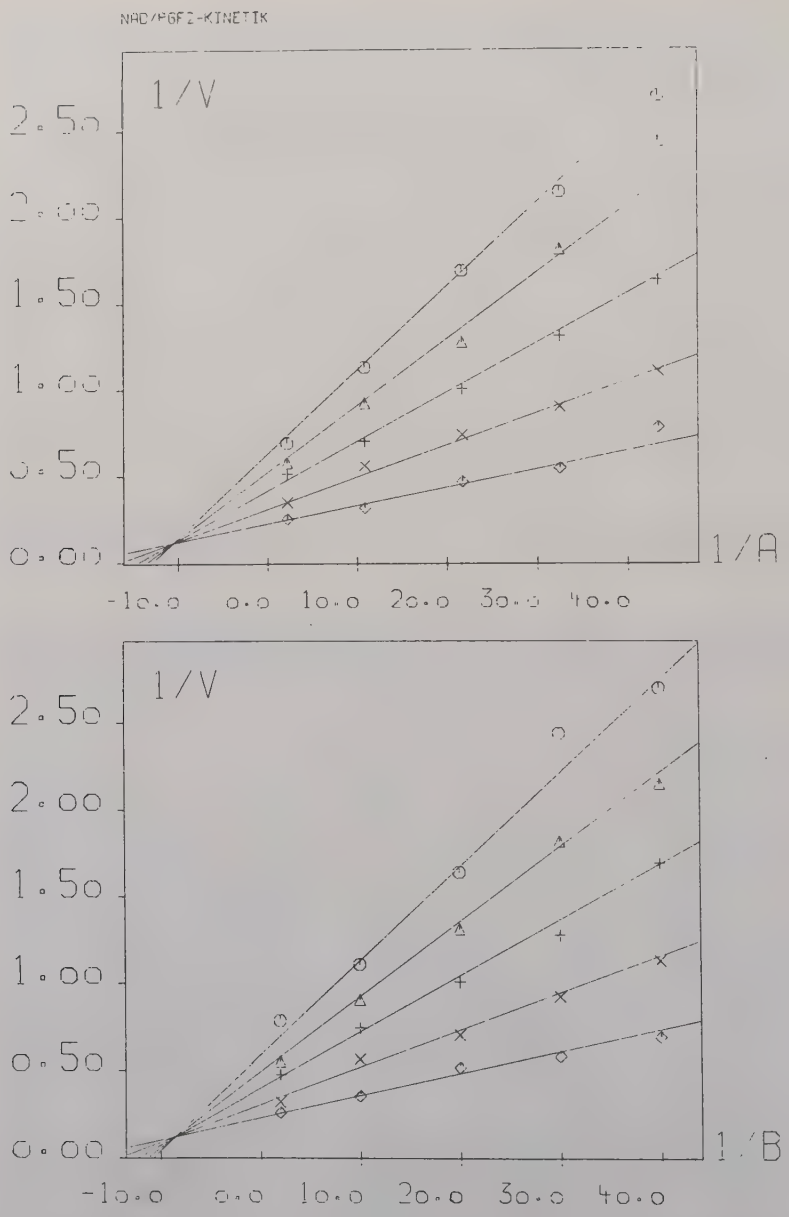
NAD/PGF2-KINETIK
1/V
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
1/A
-10.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
1/V
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
1/B
-10.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0

Abb.20

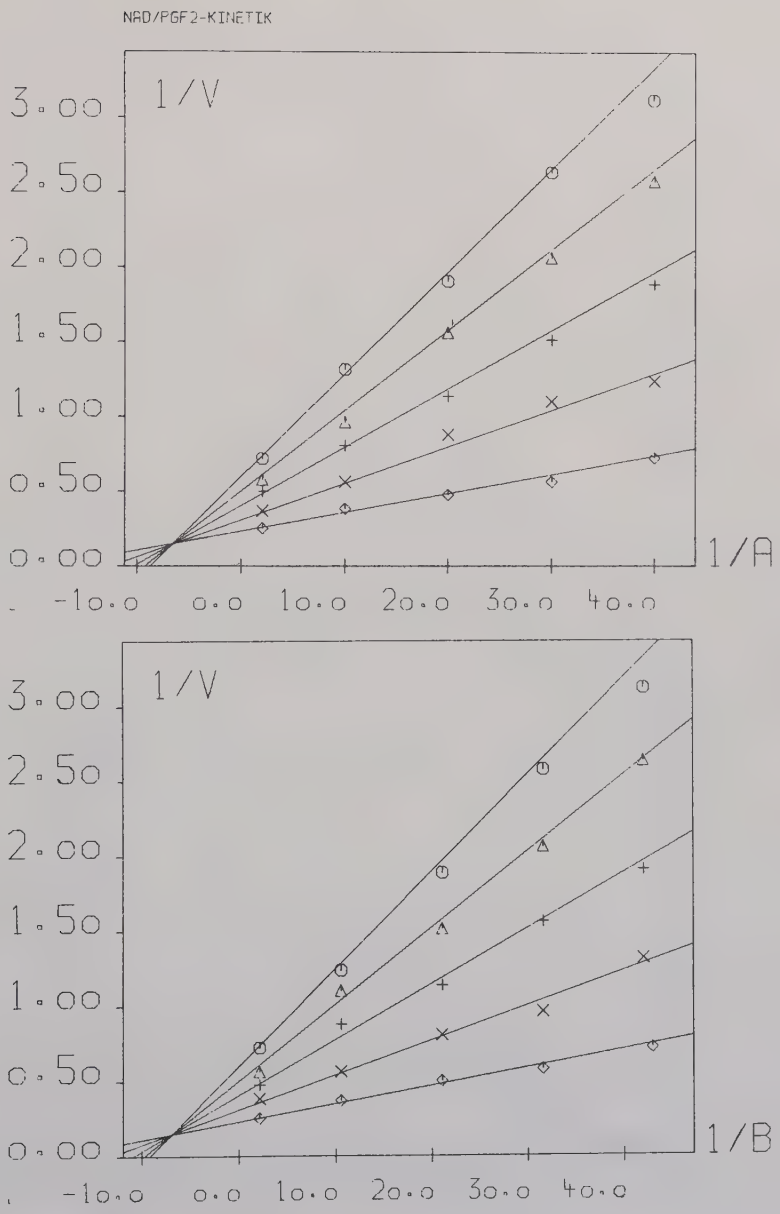
NAD/PGF2-KINETIK
1/V
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
-10.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
1/A
1/V
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
-10.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
1/B

Abb.21

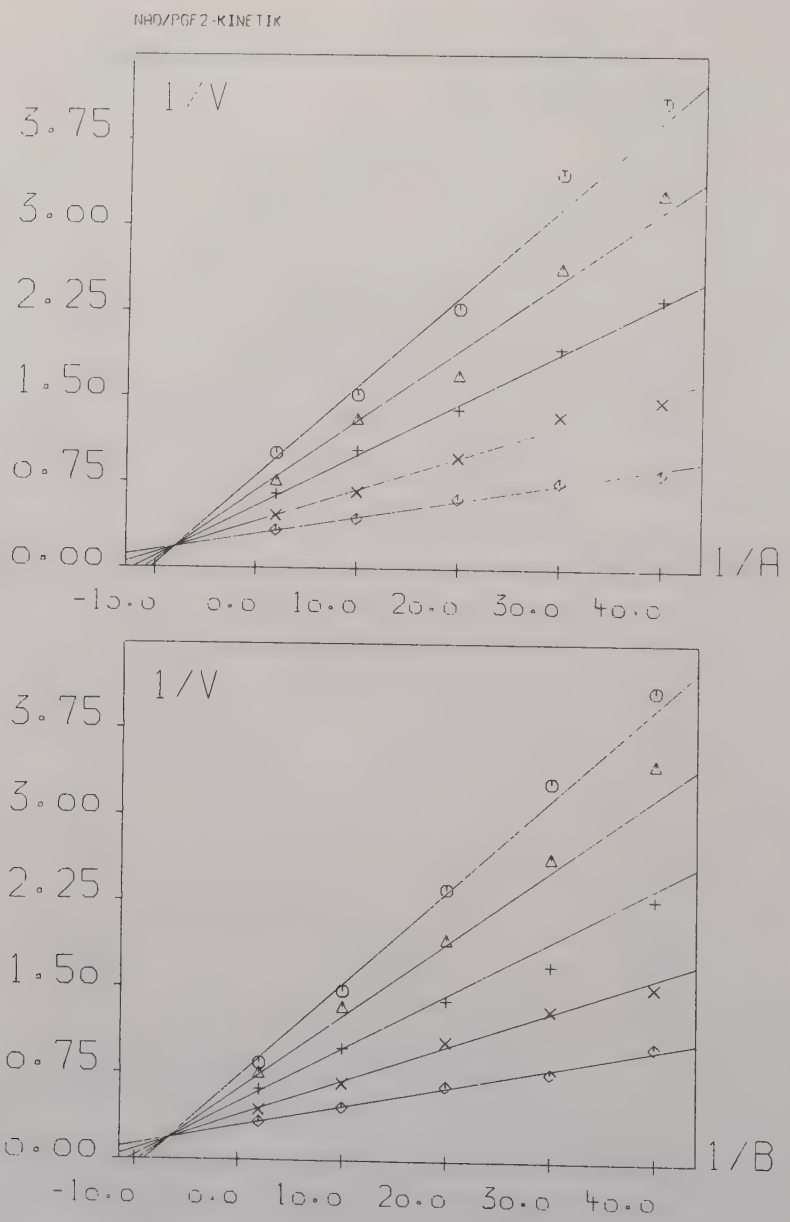
NAD/PGF2-KINETIK
1/V
3.75
3.00
2.25
1.50
0.75
0.00
-10.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
1/A
1/V
3.75
3.00
2.25
1.50
0.75
0.00
-10.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
1/B

Abb.22

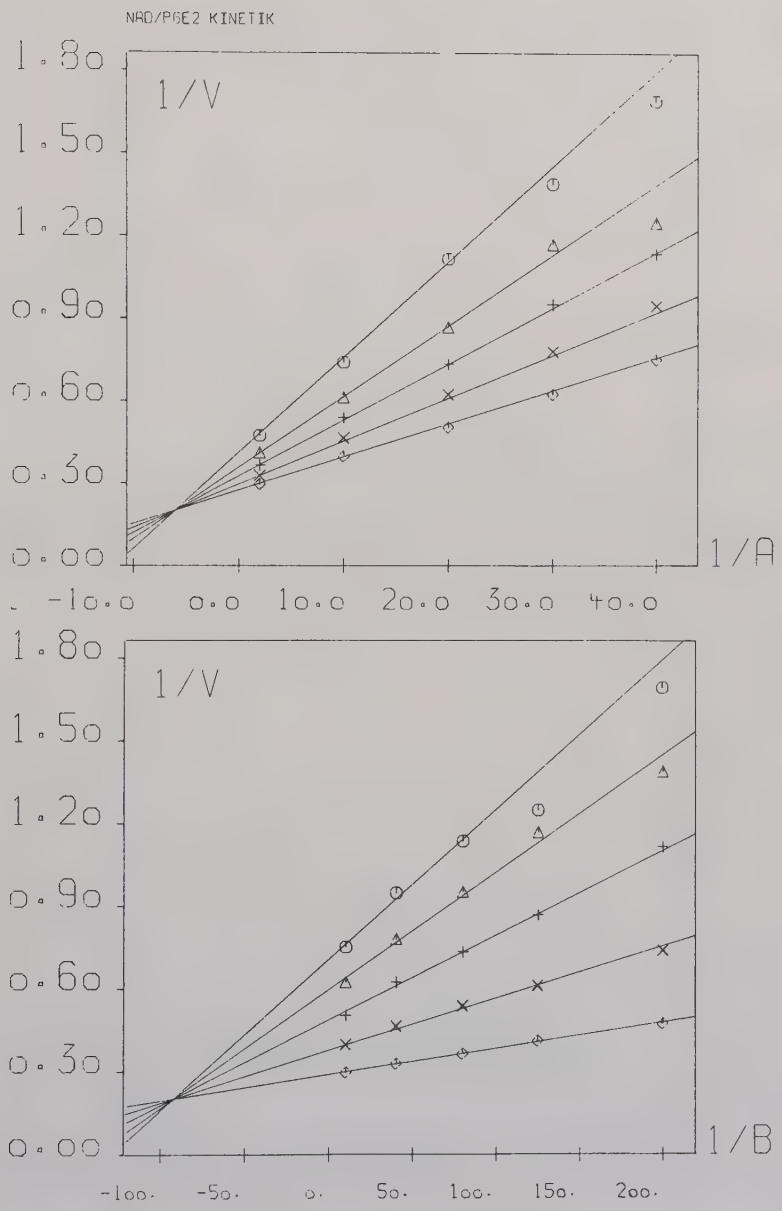
NAD/PGE2 KINETIK
1/V
1.80
1.50
1.20
0.90
0.60
0.30
0.00
1/A
-10.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
1/V
1.80
1.50
1.20
0.90
0.60
0.30
0.00
1/B
-100.
-50.
0.
50.
100.
150.
200.

Abb.23

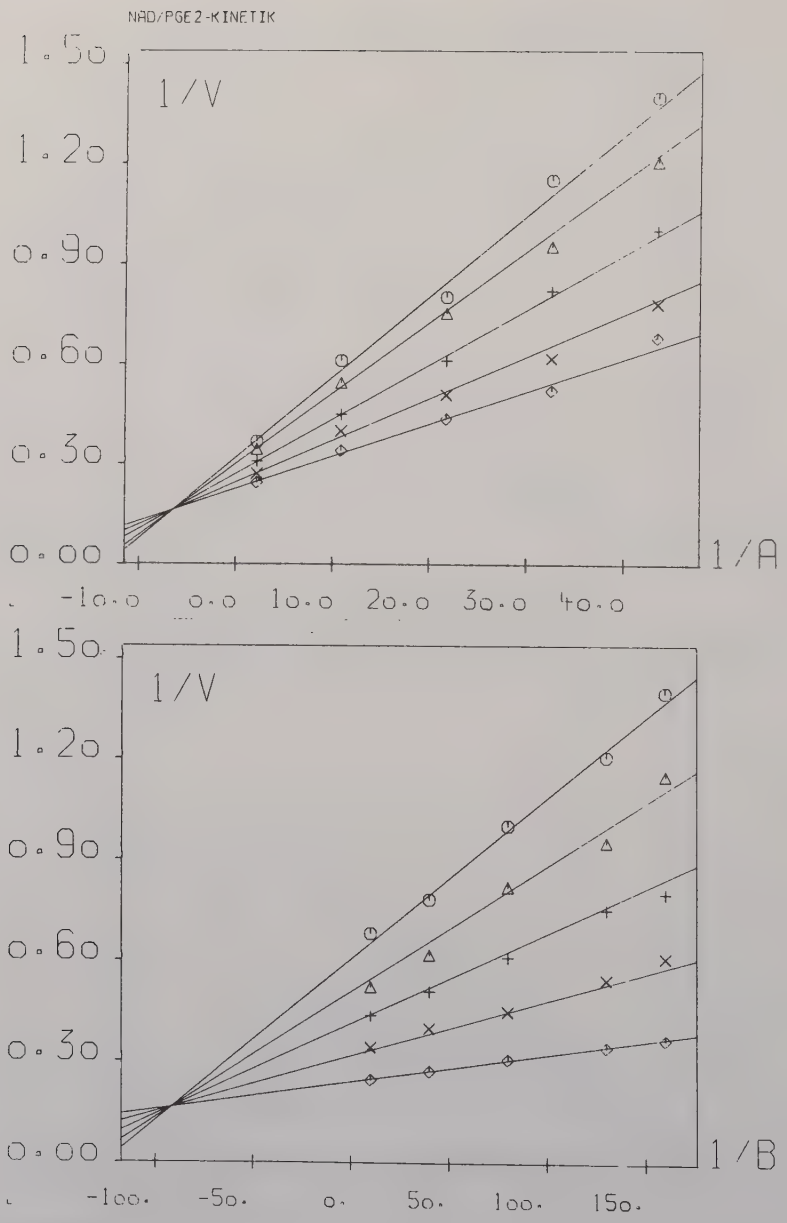
NAD/PGE2-KINETIK
1/V
1.5o
1.2o
0.9o
0.6o
0.3o
0.00
1/A
-1o.o
0.0
1o.o
2o.o
3o.o
4o.o
1/V
1.5o
1.2o
0.9o
0.6o
0.3o
0.00
1/B
-1oo.
-5o.
o.
5o.
1oo.
15o.

Abb.24

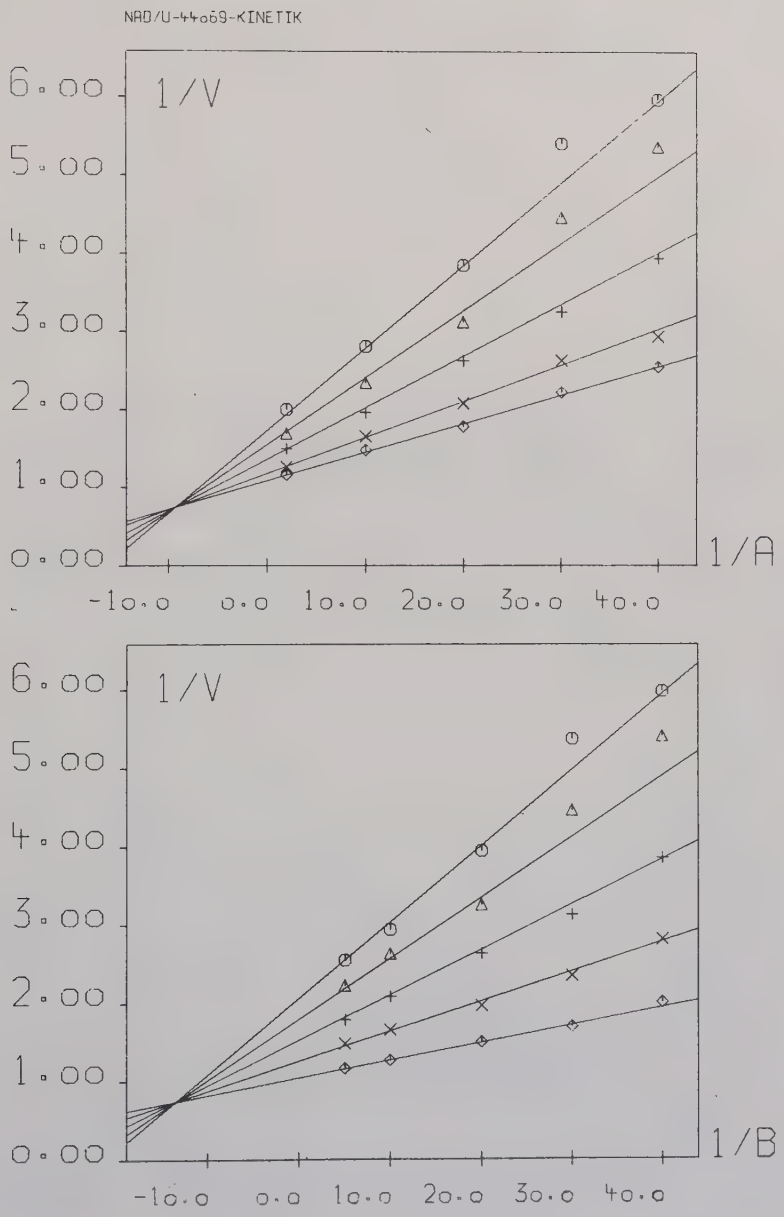
NAD/U-44o69-KINETIK
1/V
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
-10.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
1/A
1/V
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
-10.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
1/B

Abb.25

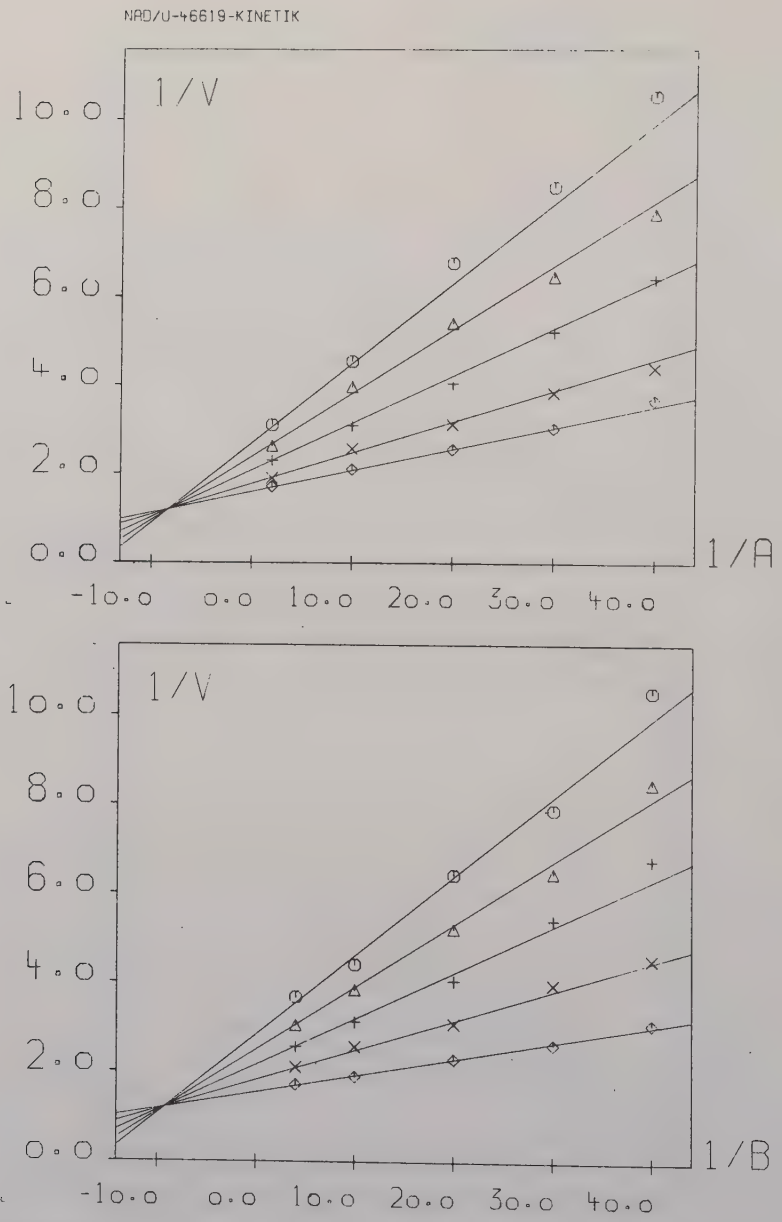
NAD/U-46619-KINETIK
1/V
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
1/A
-10.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
1/V
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
1/B
-10.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0

Abb.26

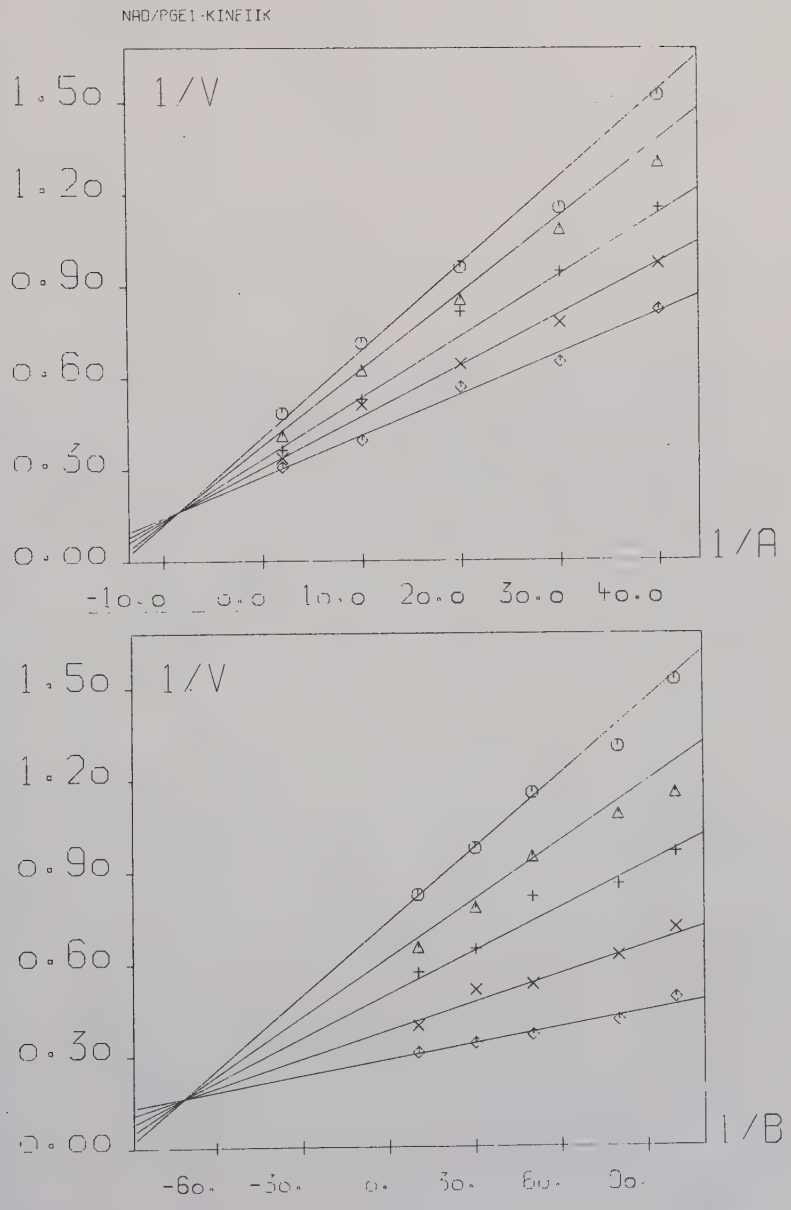
NAD/PGE1-KINETIK
1/V
1.5o
1.2o
0.9o
0.6o
0.3o
0.00
1/A
-1o.o
0.0
1o.o
2o.o
3o.o
4o.o
1/V
1.5o
1.2o
0.9o
0.6o
0.3o
0.00
1/B
-6o.
-3o.
0.
3o.
6o.
9o.

Abb.27

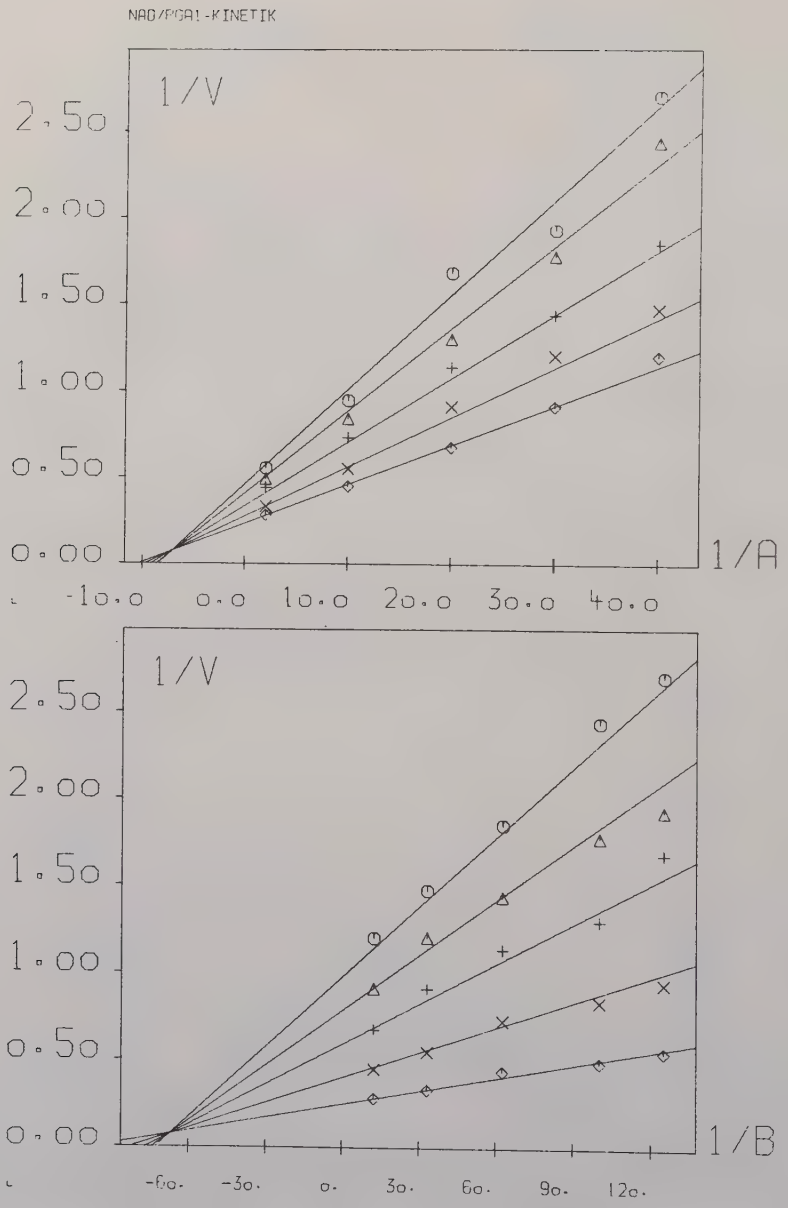
NAD/PGA1-KINETIK
1/V
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
1/A
-10.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
1/V
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
1/B
-60.
-30.
0.
30.
60.
90.
120.

Abb.28

Tab.11 Kinetische Konstanten der 15HPGDH-Hinreaktion. Die kinetischen Konstanten wurden mit ihren Standardabweichungen durch gewichtete lineare Regressionsanalyse mit einem CDC-3300 - Computer ermittelt. Erläuterung der Abkürzungen: 3.5.1. Testbdgn.: vgl. Legende Abb.19 - 28.

	zur Messung verwendete Enzymfraktion	relative V_1(%) $V_1^{PGF2\alpha}$ = 100%	K_m^{PG} (µM)	K_s^{PG} (µM)	K_m^{NAD} (µM)	K_s^{NAD} (µM)
$PGF_{2\alpha}$	A-50-Pool D	100 ± 2	21 ± 2	87 ± 7	40 ± 2	163 ± 15
	A-50-Pool I	100 ± 3	50 ± 5	116 ± 19	40 ± 4	95 ± 15
	A-50-Pool I	100 ± 3	43 ± 4	143 ± 19	46 ± 4	152 ± 20
	Phenyl-Seph.-Pool	100 ± 2	49 ± 3	148 ± 13	41 ± 3	124 ± 11
PGE_2	A-50-Pool D	107 ± 2	2.6 ± 0.2	11 ± 1	41 ± 2	168 ± 15
	A-50-Pool I	97 ± 2	2.8 ± 0.3	11 ± 1	40 ± 2	155 ± 20
U-44069	A-50-Pool I	21.4 ± 0.4	19 ± 2	74 ± 8	27 ± 2	108 ± 11
U-46619	A-50-Pool I	14.3 ± 0.3	20 ± 2	108 ± 11	23 ± 2	121 ± 11
PGE_1	A-50-Pool D	109 ± 3	5.4 ± 0.7	14 ± 3	45 ± 4	117 ± 24
PGA_1	A-50-Pool I	101 ± 3	9.6 ± 0.9	15 ± 2	92 ± 7	141 ± 21

extrapolierten Maximalgeschwindigkeiten (V_1), Dissoziationskonstanten (K_s) und limitierenden Michaeliskonstanten (K_m) zusammengefaßt. Konstanten, die unter Einsatz verschiedener Enzymfraktionen bzw. Glycerinkonzentrationen erhalten wurden, weichen nicht stärker voneinander ab als es ihrer Bestimmungsgenauigkeit entspricht. Eine Ausnahme bildet hier nur der mit A-50-Pool D erhaltene $K_m^{PGF2\alpha}$.

Während die extrapolierten Maximalgeschwindigkeiten für $PGF_{2\alpha}$, PGE_2, PGE_1 und PGA_1 im Rahmen des Meßfehlers gleich sind, liegen diejenigen für die Endoperoxidanalogen U-44069 und U-46619 deutlich tiefer. Die Affinität der PG zur entsprechenden Enzymform ist relativ hoch für die PGE und PGA_1, gefolgt von den Endoperoxidanalogen und am geringsten für $PGF_{2\alpha}$, wobei die Dissoziationskonstanten um ca. eine Zehnerpotenz differieren. Ähnliches gilt für die limitierenden Michaeliskonstanten für die PG.

Die doppelt reziproken Diagramme der PGE und $PGF_{2\alpha}$ sind oberhalb der für die Kreuzserien verwendeten Konzentrationen nicht mehr linear. PGE_1 zeigt Substrathemmung (Abb.29), während PGE_2 (Abb.30) und $PGF_{2\alpha}$ (Abb.31) bei hohen Konzentrationen das Phänomen einer "Substrataktivierung" hervorrufen. In Abb.32 sind die Bereiche hoher Substratkonzentrationen der Abb.29-31 vergrößert dargestellt.

In den verwendeten Konzentrationsbereichen zeigte mit den üblichen Tests keines der oben beschriebenen PG oder Endoperoxidanalogen eine Spontanreaktion mit NAD, d.h. ohne Enzym, oder eine Extinktionsveränderung bei 340nm in Gegenwart des Enzyms und bei Abwesenheit von NAD.

Abb.29 "Substrathemmung" durch hohe PGE1-Konzentrationen. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 0.5mM NAD. PGE1 wurde zwischen 0.00625 und 2.5mM variiert. Enzym: A-50-Pool I.

Abb.30 "Substrataktivierung" durch hohe PGE2-Konzentrationen. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4. PGE2 wurde zwischen 0.00625 und 5mM variiert. (a): 0.05mM NAD, A-50-Pool II. (b): 2mM NAD, A-50-Pool I.

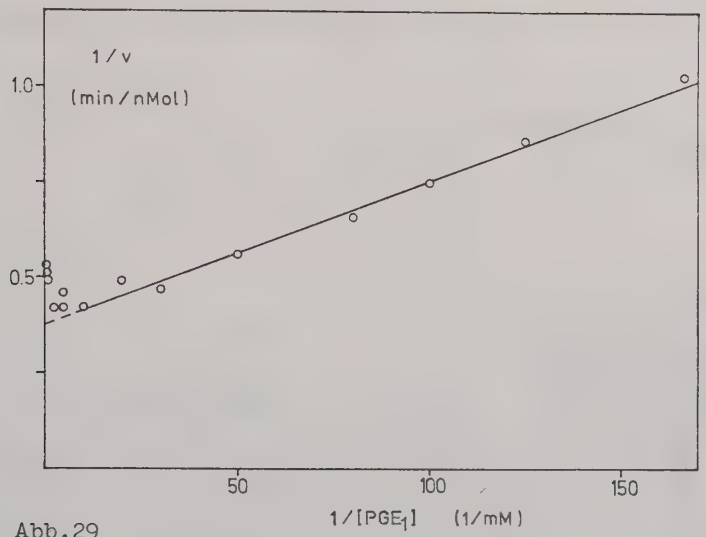
1/v
(min/nMol)
1.0
0.5
50
100
150
1/[PGE1] (1/mM)

Abb.29

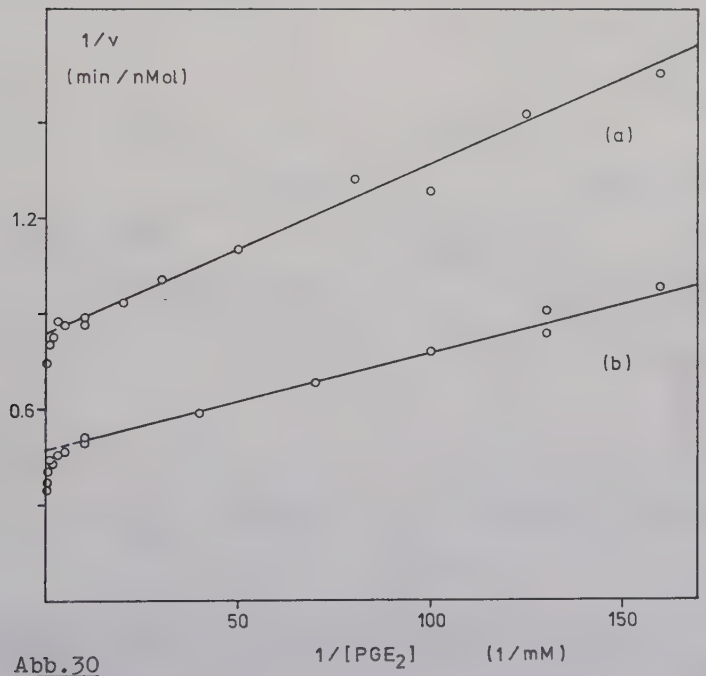
1/v
(min/nMol)
(a)
(b)
1.2
0.6
50
100
150
1/[PGE2] (1/mM)

Abb.30

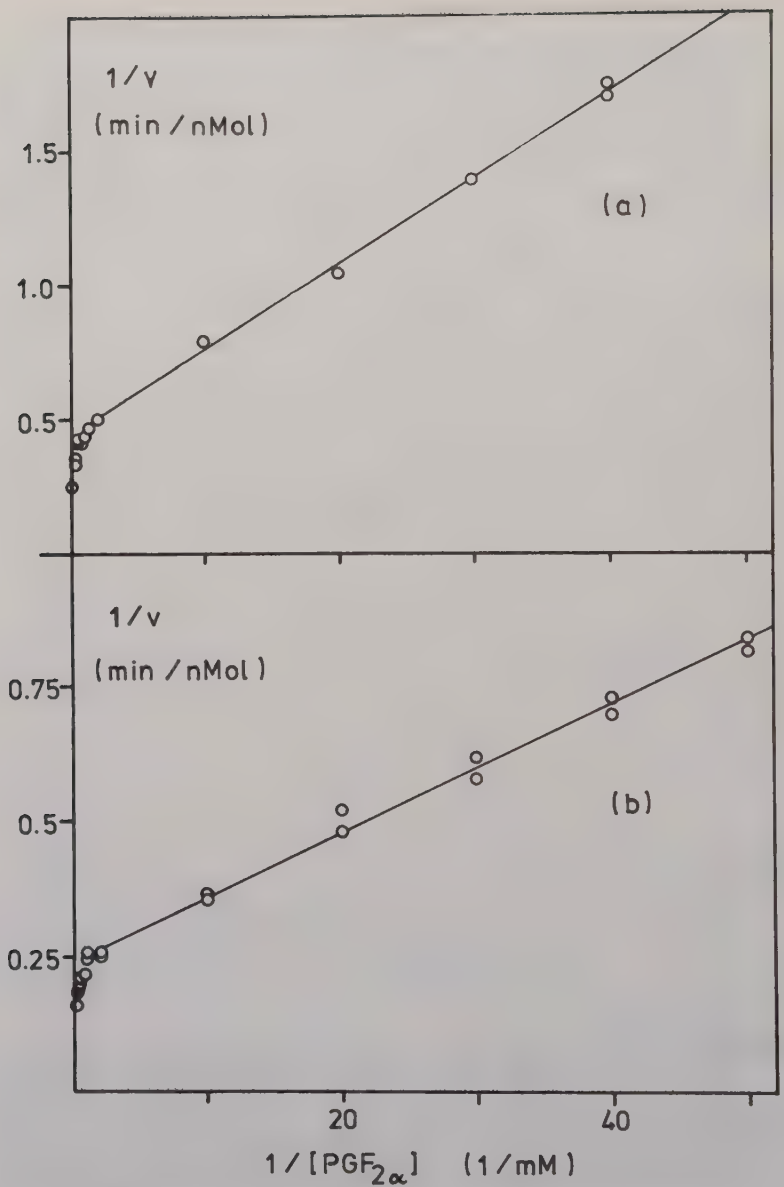

Abb.31 "Substrataktivierung" durch hohe PGF2α-Konzentrationen. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4. (a): 0.1mM NAD, 0.025-8mM PGF2α, Phenyl-Seph.-Pool. (b): 0.5mM NAD, 0.02-5mM PGF2α, A-50-Pool I.

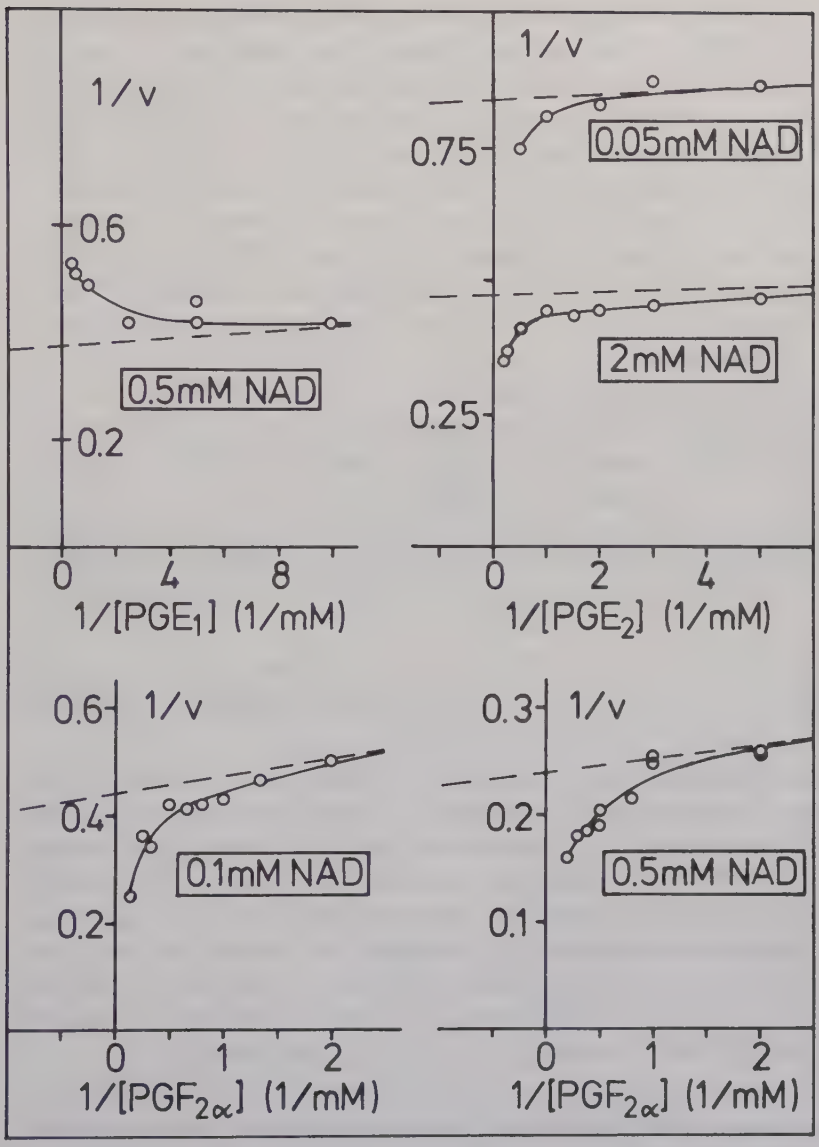

Abb.32 Bereiche hoher Substratkonzentrationen der Abb.29 bis 31. 1/v in min/nMol. ---: Verlängerungen der linearen Bereiche bei niedrigen Substratkonzentrationen. Für die verschiedenen Meßreihen wurden z.T. verschiedene Enzymfraktionen eingesetzt (vgl. Abb.29-31).

4.5.2. Prostaglandin D2 und Thromboxan B2 als Substrate

Zur direkten Messung von 15KPGD$_2$ bei kinetischen Untersuchungen mit PGD$_2$ mußte zunächst gezeigt werden, daß es sich bei dem gebildeten Produkt tatsächlich um 15KPGD$_2$ handelte. Die gemeinsame Inkubation relativ hoher Konzentrationen von PGD$_2$, NAD und 15HPGDH in 100mM TRAP bei pH 7.4 (vgl. 3.3.2.) führte neben der hauptsächlich durch NADH verursachten Extinktionszunahme bei 340nm zu der Bildung eines gelben Produkts, das sich beim Ansäuern entfärbte. Wurde der pH wieder über 6-7 erhöht, erschien die Farbe erneut und nahm in ihrer Intensität bei weiterer Erhöhung des pH zu. Das Produkt war bei pH 3.5 mit Essigester extrahierbar. Ein Spektrum des Essigesterextraktes (vgl. 3.3.3.) wies ein Absorptionmaximum bei ca. 290nm und oberhalb 400nm keine Absorption auf. Eine Rückextraktion bei pH 8 in 0.1M KP führte neuerlich zu einer gelben Farbe und zu einem Spektrum, welches nun ein Absorptionsmaximum bei ca. 420nm zeigte. Dessen Extinktionskoeffizient nahm mit steigendem pH zu und ging beim Ansäuern auf pH 3.5 gegen null. Die gelbe Farbe und die Absorption bei 420nm konnten nicht festgestellt werden, wenn PGD$_2$, NAD oder 15HPGDH aus dem Inkubationsansatz weggelassen wurde.

Das Produkt erwies sich bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel mit Laufmittel I (vgl. 3.3.1.) als weniger polar als PGD$_2$. Es konnte auf der Platte in NH_3-Atmosphäre als gelber Fleck und nach Extraktion von der Platte durch sein typisches Verhalten gegen Säuren und Alkali (s.o.) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu einigen Verunreinigungen bzw. nichtenzymatischen Reaktionsprodukten von PGD$_2$ trat es in Chromatogrammen von Kontrollansätzen ohne Enzym oder NAD nicht auf.

Die bei 420nm in 100mM TRAP bei pH 8 mit 1mM NAD gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten der enzymatischen PGD$_2$-Umsetzung waren 6-10min und das so erhaltene Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb.33) zwischen 0.05 und 0.8mM PGD$_2$ linear. Für PGD$_2$ war die scheinbare Michaeliskonstante 0.5mM und die relative Maximalgeschwindigkeit betrug ca. 1% gegenüber derjenigen von PGF$_{2\alpha}$.

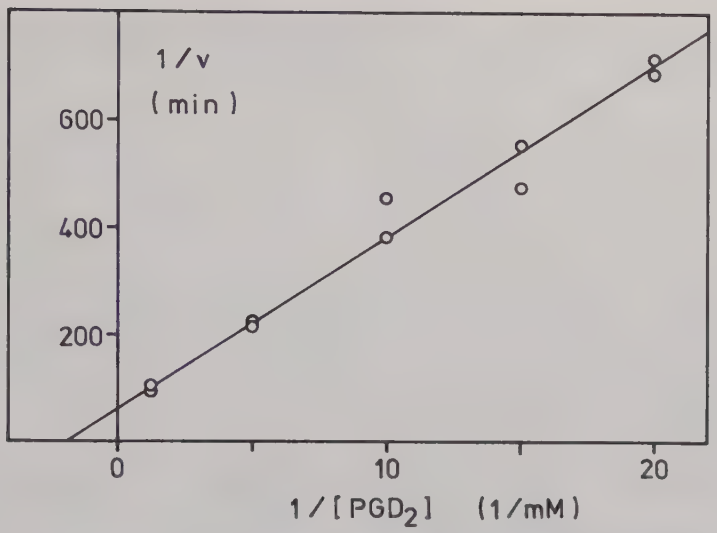

Abb.33 Lineweaver-Burk-Diagramm für PGD2 als Substrat der 15HPGDH. Die Anfangsgeschwindigkeiten v (ΔE/min) wurden bei 420nm ermittelt. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 8, 1mM NAD, 0.05-0.8mM PGD2, 1% Äthanol, A-50-Pool I.

Die enzymatische Reaktion von "ungereinigtem" Thromboxan B_2 (TXB_2) mit 1mM NAD (Tab.12) führte zu einem nichtlinearen Lineweaver-Burk-Diagramm. Aus dem quasi linearen Bereich zwischen 0.1 und 0.5mM TXB_2 würde sich eine scheinbare Michaeliskonstante von 0.5mM und eine Maximalgeschwindigkeit ergeben, die 13% gegenüber der von $PGF_{2\alpha}$ betrüge. TXB_2 hemmte die enzymatische Umsetzung von $PGF_{2\alpha}$ mit 0.1mM NAD selbst in zehnfachem Überschuß nicht (Tab.13). Weitere Untersuchungen waren in Ermangelung von Substanz nicht möglich.

4.5.3. Prostaglandinanaloge und Prostaglandin B1 als "Inhibitoren"

Folgende PG und PG-Analoge waren in 100mM TRAP bei pH 7.4 und 37°C mit 1 oder 2mM NAD und einer Enzymkonzentration von mindestens 15mIU/ml i.T. keine Substrate der 15HPGDH (in Klammern der überprüfte Konzentrationsbereich): PGB_1 (0.025-0.5mM), 15-Methyl-PGE_2 und 15-Methyl-$PGF_{2\alpha}$

Tab.12 Überprüfung der Substrataktivität von TXB2 gegenüber 15HPGDH. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 1mM NAD(fest), 0.5% Äthanol, A-50-Pool I. Mit "ungereinigtem" TXB2 überladene Dünnschichtchromatogramme (Nano-Platten SIL-20) zeigten nach der Entwicklung mit Laufmittel I und II (3.3.1) eine geringe Verunreinigung, die den gleichen R_f wie $PGF2\alpha$ aufwies. Durch eine präparative Dünnschichtchromatographie mit Laufmittel I, nach der TXB2 mit Essigester vom Kieselgel des entsprechenden Plattenbereichs extrahiert, der Extrakt eingeengt und in Äthanol aufgenommen wurde, gelang es, diese Verunreinigung zu entfernen. Allerdings zeigte ein Kontrollchromatogramm des "gereinigten" TXB2 drei neue Flecken. In Ermangelung einer Bestimmungsmethode erfolgte die Abschätzung der TXB2-Konzentration im Äthanolextrakt über die Farbintensität des mit Phosphormolybdänsäure angefärbten Flecks nach Dünnschichtchromatographie auf Nano-Platten SIL-20 durch Vergleich mit einer entsprechend behandelten Verdünnungsreihe des "ungereinigten" TXB2.

Substrat	Konzentration i.T. (mM)	15H PGDH	NAD	v (nMol/min)
$PGF_{2\alpha}$	0.5	+	+	7.2
TXB_2 "ungereinigt"	0.5	-	+	0
	0.5	+	-	0
	0.5	+	+	0.48,0.50,0.52
	0.125	+	+	0.20
	0.1	+	+	0.16
	0.071	+	+	0.107
	0.05	+	+	0.058, 0.064
TXB_2 "gereinigt"	≤ 0.1	+	+	0.05

(0.01-0.5mM), ICI 79,939 und ICI 81,008 (0.0005-1mM) und ICI 86,384, ICI 86,768, ICI 87,904 sowie ICI 87,907 (1-2mM). 15-Methyl-$PGF_{2\alpha}$ war auch kein Inhibitor der 15HPGDH-Reaktion, während 15-Methyl-PGE_2 eine sehr schwache Hemmung zeigte (Tab.13). Allerdings wurde bei der Reinheitskontrolle von 15-Methyl-PGE_2 durch Dünnschichtchromatographie auf Nano-Platten SIL-20 mit Laufmittel I und II eine geringe weniger polare Verunreinigung gefunden. PGB_1 zeigt von den in Tab.13 überprüften Substanzen die stärkste Hemmung. Seine Hemmung gegenüber PGE_2 ist kompetitiv (Abb.34)

und die gegenüber NAD unkompetitiv (Abb.35). Aus dem K_{iSt} der Abb.34b von 17.5µM errechnet sich nach 3.5.2. unter der Annahme, daß es sich bei PGB_1 um einen kompetitiven "dead-end"-Inhibitor gegenüber dem zweiten Substrat in einem Ordered Bi Bi Mechanismus handelt, eine Inhibitorkonstante für PGB_1 von 15µM. Die PGB_1-Hemmung ist im untersuchten Konzentrationsbereich linear (Abb.36).

Die Hemmungen der 15HPGDH-Reaktion durch einige $PGF_{2\alpha}$-Analoge, die an Stelle des endständigen Butylrestes von $PGF_{2\alpha}$ eine substituierte Phenoxygruppe tragen (vgl. 2.3.1.), sind in Tab.12 miteinander verglichen. ICI 86,384 hemmt bei variablem $PGF_{2\alpha}$ kompetitiv mit einem K_{iSt} von 78µM (Abb.37). Die ICI 87,907-Hemmung ist kompetitiv gegenüber PGE_2 (Abb.40), nichtkompetitiv gegenüber NAD (Abb.38) und nicht linear (Abb.38,39).

4.5.4. Nucleotide als Substrate und "Inhibitoren"

Die doppelt reziproken Diagramme für NAD, das natürliche Substrat dieser 15HPGDH, sind bis 5mM NAD linear (Abb.41). Wie aus Tab.11 hervorgeht, sind die K_m^{NAD} für die Substrate $PGF_{2\alpha}$ mit 42µM, PGE_2 mit 40µM und PGE_1 mit 45µM im Rahmen des Meßfehlers gleich, während die der Endoperoxidanalogen und von PGA_1 sich von ihnen unterscheiden. Demgegenüber differieren die K_s^{NAD} von PG zu PG nicht signifikant.

Ac-NAD und S-NAD sind ebenfalls Substrate der 15HPGDH. Für Ac-NAD wurde nur eine scheinbare Michaeliskonstante von 0.7mM unter den in Abb.42 erwähnten Bedingungen bestimmt. Die mit NAD unter entsprechenden Bedingungen erhaltene Maximalgeschwindigkeit ist viermal höher als die von Ac-NAD. Die vom Computer ausgedruckten S-NAD/PGE_2-Primärdiagramme sind in Abb.43 dargestellt. Durch gewichtete lineare Regressionsanalyse wurden folgende Konstanten mit ihren Standardabweichungen erhalten: $K_m^{S\text{-}NAD} = (39 \pm 6)$µM, $K_s^{S\text{-}NAD} = (95 \pm 23)$µM, $K_m^{PGE2} = (11.3 \pm 1.5)$µM, $K_s^{PGE2} = (28 \pm 8)$µM und $V_1^{S\text{-}NAD} = (0.28 \pm 0.03)V_1^{NAD}$. Beide NAD-Analoge haben also Maximalgeschwindigkeiten von etwa einem Viertel, verglichen mit NAD. Die Affinität von S-NAD zum Enzym ent-

Tab.13 PGB1 und PG-Analoge als "Inhibitoren" der 15HPGDH-Reaktion. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 37°C.

NAD-Konzentration i.T. (mM)	$PGF_{2\alpha}$-Konzentration i.T. (mM)	"Inhibitor"	Aktivität in % der entsprechenden ungehemmten Reaktion
0.5	0.025	0.50mM PGB_1	5
	0.025	0.25mM PGB_1	9
	0.05	0.25mM PGB_1	11
	0.5	0.25mM PGB_1	31
0.5	0.05	0.5mM 15-Methyl-$PGF_{2\alpha}$	100
		0.5mM 15-Methyl-PGE_2	94
		1.0mM 15-Methyl-PGE_2	87
1.0	0.0125	0.5mM ICI 79,939	91
	0.02		98
	0.05		99
1.0	0.0125	1.0mM ICI 79,939	94
	0.02		97
	0.05		98
1.0	0.0125	0.5mM ICI 81,008	80
	0.02		87
	0.05		88
0.1	0.05	0.2mM ICI 86,384	52
		0.2mM ICI 86,768	52
		0.2mM ICI 87,904	51
		0.2mM ICI 87,907	55
0.1	0.05	0.5mM TXB_2	99

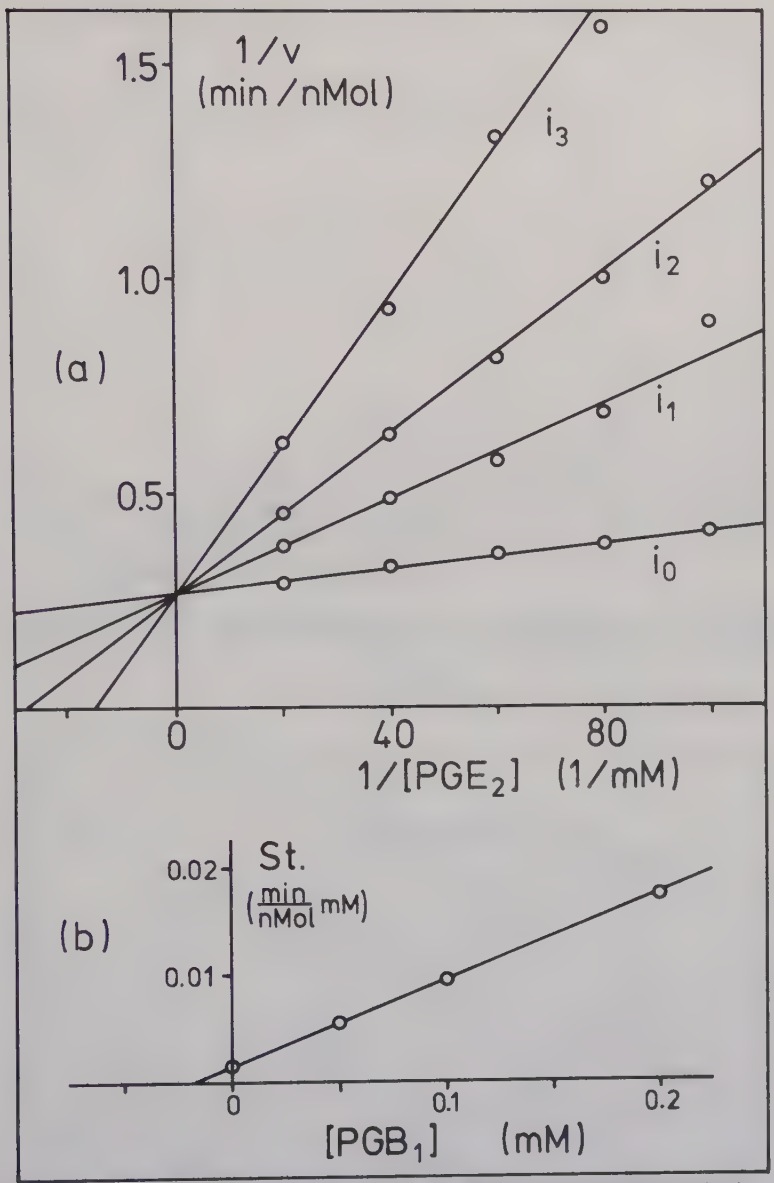

Abb.34 PGB1 als Inhibitor der 15HPGDH-Hinreaktion bei variablem PGE2. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 1mM NAD (fest), 0.01-0.05mM PGE2; 0(i0), 0.05(i1), 0.1(i2) und 0.2 (i3)mM PGB1. (a): Primärdiagramm. (b): Sekundärdiagramm Steigungen (St.) gegen PGB1-Konzentration.

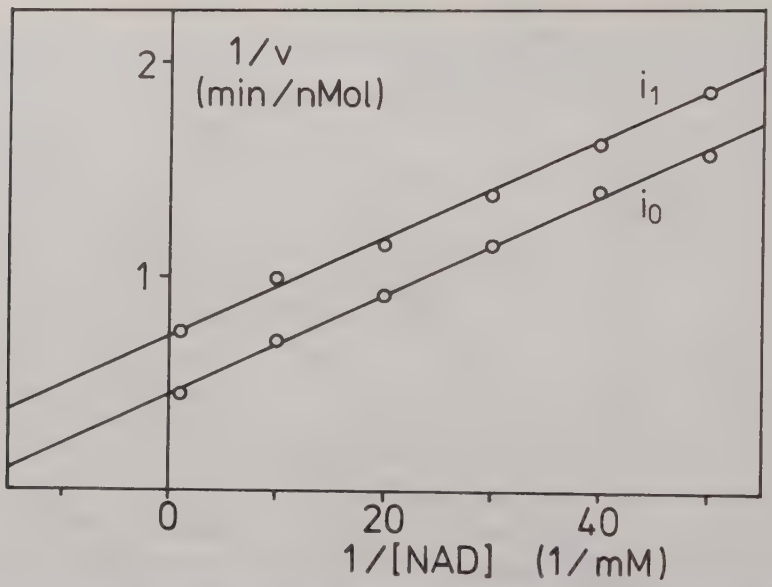

Abb.35 Primärdiagramm der PGB1-Hemmung bei variablem NAD. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 0.05mM PGE2 (fest), 0.02-1 mM NAD; 0(i0) und 0.12(i1)mM PGB1.

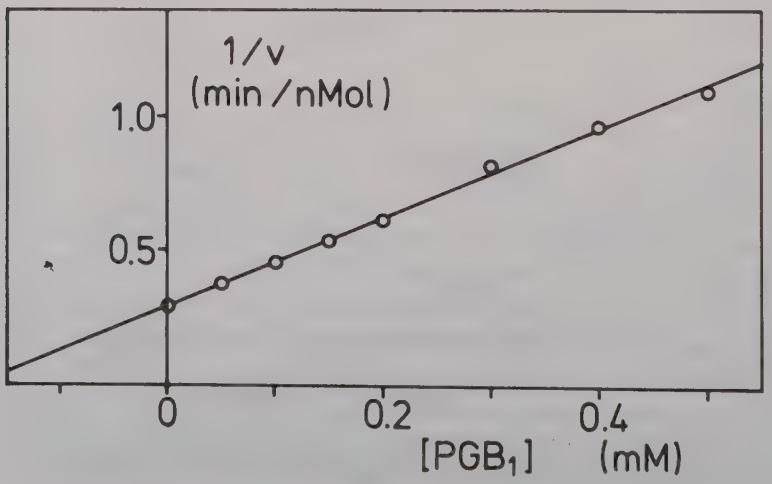

Abb.36 Dixon-Diagramm der PGB1-Hemmung. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 1mM NAD (fest), 0.05mM PGE2 (fest), 0-0.5mM PGB1.

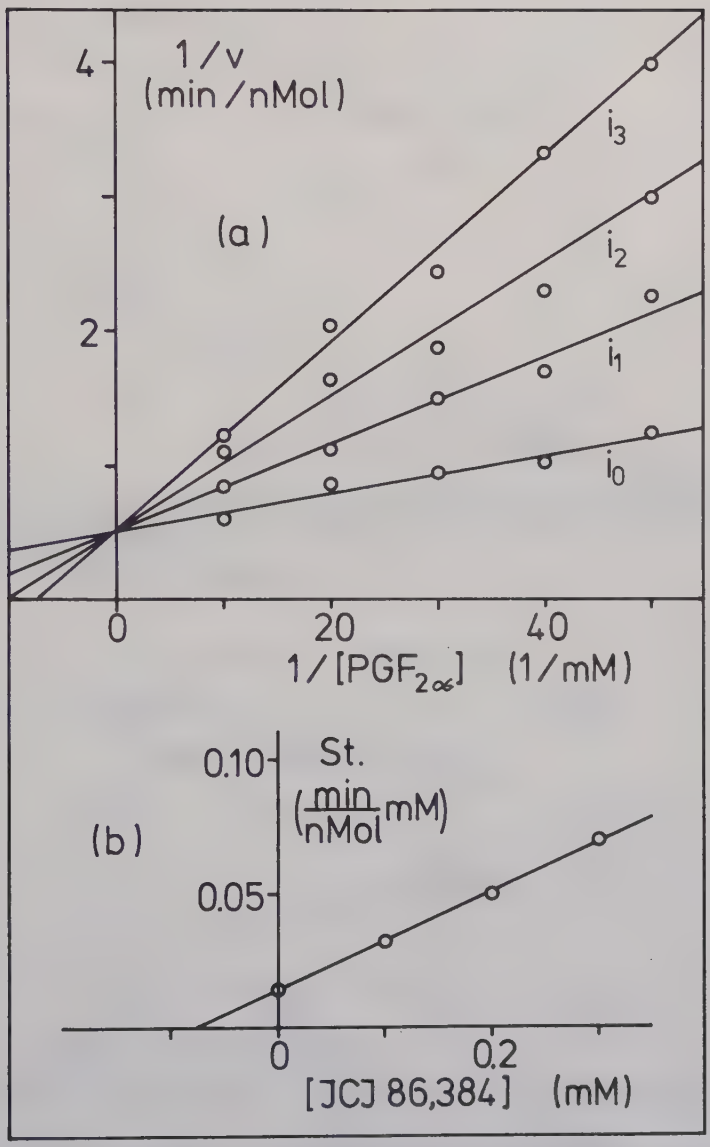

Abb.37 ICI 86,384 als Inhibitor der 15HPGDH-Reaktion bei variablem PGF2α. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 0.1mM NAD (fest), 0.02-0.1mM PGF2α; 0(i0), 0.1(i1), 0.2(i2) und 0.3 (i3)mM ICI 86,384. (a): Primärdiagramm. (b): Sekundärdiagramm Steigungen (St.) gegen Inhibitor-Konzentration.

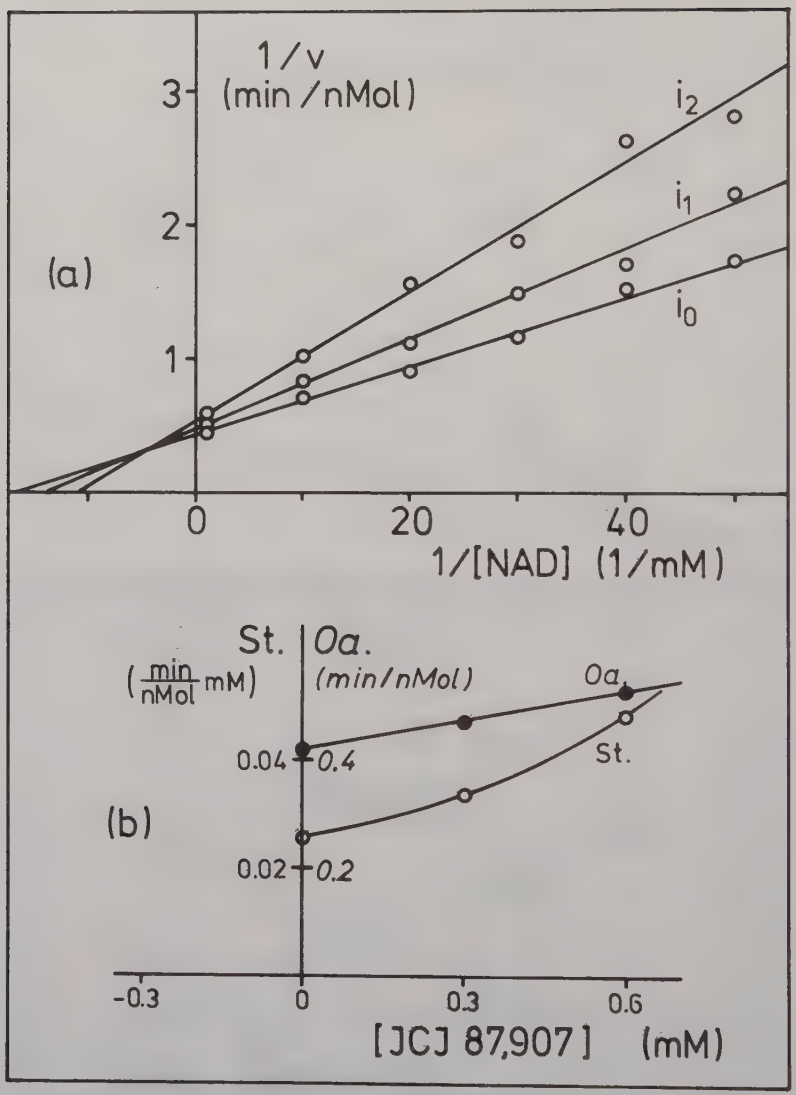

Abb.38 ICI 87,907 als Inhibitor der 15HPGDH-Reaktion bei variablem NAD. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 0.05mM PGE2 (fest), 0.02-1mM NAD; 0(i0), 0.3(i1) und 0.6(i2)mM ICI 87,907. (a): Primärdiagramm. (b): Sekundärdiagramm Ordinatenabschnitte (Oa.) und Steigungen (St.) gegen Inhibitor-Konzentration.

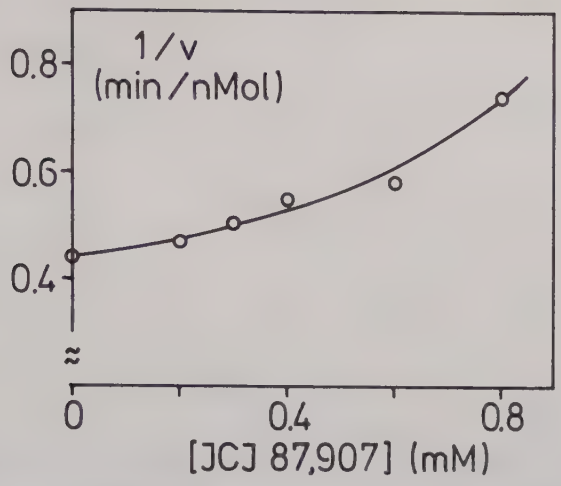

Abb.39 Dixon-Diagramm der ICI 87,907-Hemmung der 15HPGDH-Reaktion. Testbdgn.: 1mM NAD (fest), 0.05mM PGE2 (fest), 100mM TRAP, pH 7.4.

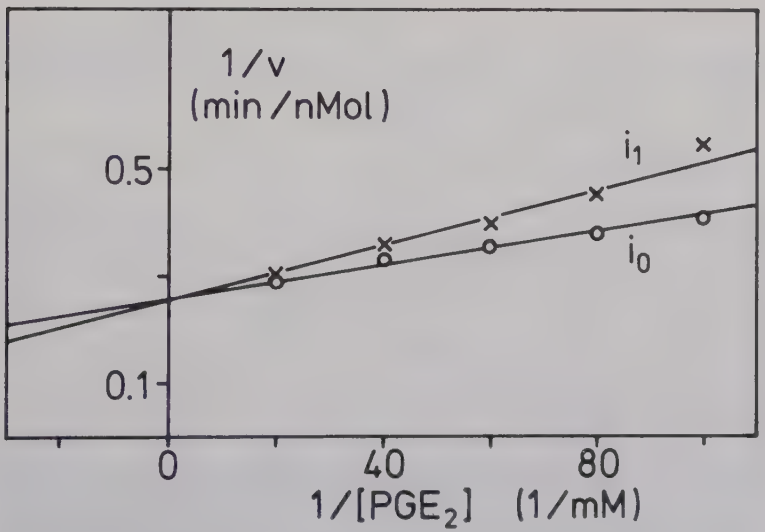

Abb.40 ICI 87,907-Hemmung bei variablem PGE2 und festem NAD. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 1mM NAD, 0.01-0.05mM PGE2; 0(i0) und 0.3(i1)mM ICI 87,907.

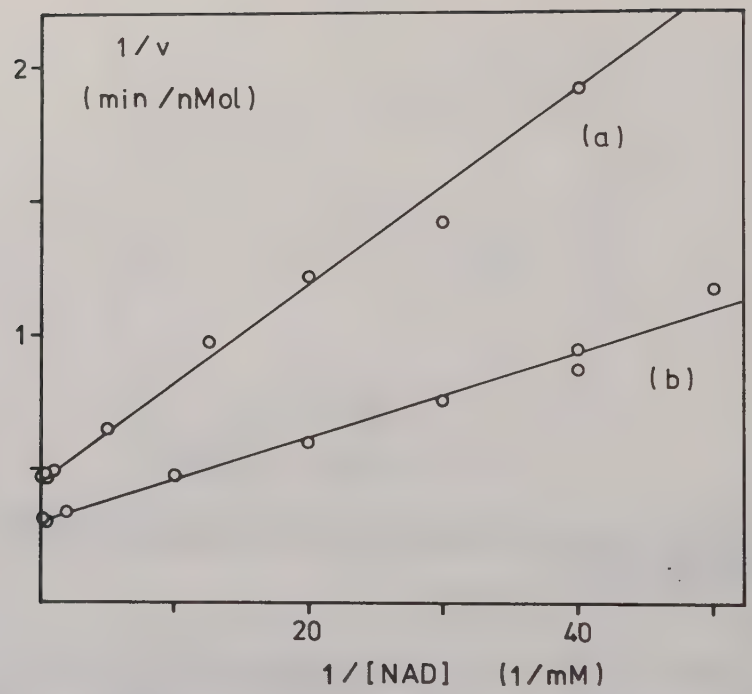

Abb.41 Lineweaver-Burk-Diagramme für hohe NAD-Konzentrationen. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4. (a): 0.2mM PGF2α (fest), 0.025-5mM NAD, Phenyl-Seph.-Pool. (b): 0.01mM PGE2 (fest), 0.02-4mM NAD, A-50-Pool I.

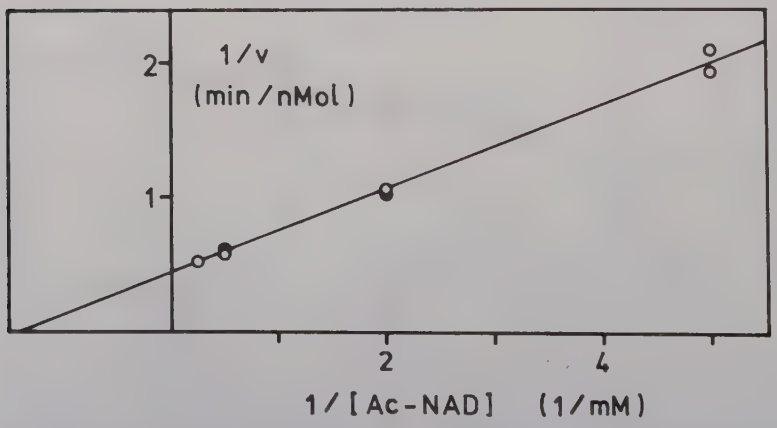

Abb.42 Lineweaver-Burk-Diagramm für Ac-NAD als Substrat der 15HPGDH. Testbdgn.: 400mM TRAP, pH 7.4, 0.05mM PGE2 (fest), 0.2-4mM Ac-NAD. Messung bei 363nm.

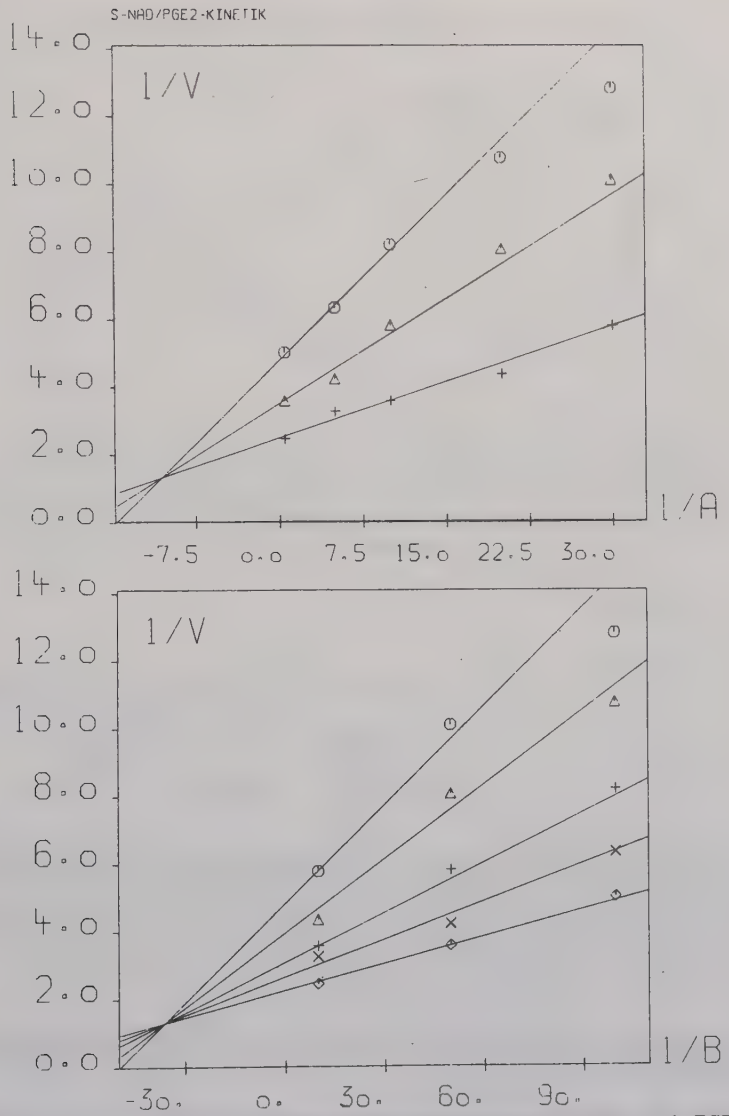

Abb.43 Anfangsgeschwindigkeitsmuster für S-NAD und PGE2. Computerdiagramme (CDC-3300, Fortran, gewichtete lineare Regressionsanalyse) auf der Basis der bei 398nm ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten (v, nMol/min). A ≙ S-NAD-Konzentration (mM), B ≙ PGE2-Konzentration (mM). Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 0.033-2mM S-NAD, 0.01-0.2mM PGE2.

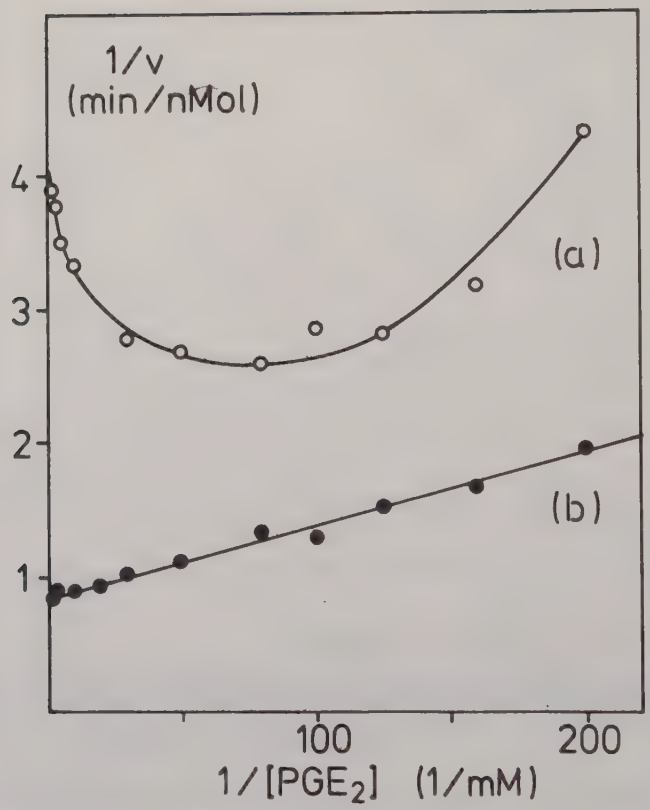

Abb.44 S-NAD-Konkurrenz zur Hinreaktion bei festem NAD und variablem PGE2. Die reziproken Anfangsgeschwindigkeiten der bei 342nm bestimmten Reaktion zwischen NAD und PGE2 wurden in Gegenwart (a) und in Abwesenheit (b) von 0.1mM S-NAD gegen die reziproke PGE2-Konzentration aufgetragen. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 0.05mM NAD, 0.005-0.5mM PGE2

Tab.14 Einfluß zyklischer Nucleotide auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Testbdgn.: 0.1mM NAD, 0.05mM PGF2α, 100mM TRAP, pH 7.4, 37°C.

[cAMP] [cGMP] (M)		10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Aktivität in % der ungehemmten Reaktion	cAMP	103	93	101	97	102		
	cGMP	100		105		98	97	55

spricht der von NAD, während Ac-NAD eine wesentlich geringere Affinität aufweist.

S-NAD wurde als alternatives Substrat zu NAD nach der Methode von Rudolph & Fromm (1970) eingesetzt. Eine feste S-NAD-Konzentration von 0.1mM i.T. ergibt bei Messung der NAD/PGE_2-Reaktion bei 342nm, dem isosbestischen Punkt von S-NAD/S-NADH, eine "Hemmung", die gegen die reziproke PGE_2-Konzentration aufgetragen nicht linear ist (Abb.44). Die erhaltene Kurve ist aufwärts konkav und entspricht in ihrem Verlauf der allgemeinen Gleichung (vgl. 3.5.2.) nach Fromm (1975).

NADP ist kein Substrat des gereinigten Enzyms (4.3.4.) und ein sehr schwacher Inhibitor der enzymatischen Reaktion (Tab.15). Auch cAMP, cGMP und AMP führen erst beim Einsatz im mM-Bereich zu einer deutlichen Hemmung (Tab.14,15).

Tab.15 Einfluß verschiedener Nucleotide auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 37°C.

NAD-Konzentration i.T. (mM)	PG	Nucleotid ("Inhibitor")	Aktivität in % der entsprechenden ungehemmten Reaktion
0.1	0.05mM $PGF_{2\alpha}$	2mM NADP	89
0.5	0.05mM PGE_2	1mM NADP	93
0.05		2mM NADP	86
0.05		0.1mM NADPH	100
0.05		10mM cAMP	71
0.1		10mM AMP	58
0.05		10mM AMP	48
0.5	0.1mM PGE_1	6mM AMP	90
0.1		6mM AMP	75

4.5.5. Produktinhibitionsmuster der Hinreaktion

Die Hemmung des Produktes NADH gegenüber NAD ist sowohl bei Verwendung von $PGF_{2\alpha}$ (0.2mM, Abb.45) als auch PGE_1 (0.1mM, Abb.46) als nichtvariable Substrate kompetitiv. Bei konstantem NAD hemmt NADH gegenüber $PGF_{2\alpha}$ nichtkompetitiv (Abb.47) nach der Definition von Cleland (1970). $15KPGF_{2\alpha}$, $15KPGE_1$ und $15KPGE_2$ zeigen gegenüber den entsprechenden PG eine nichtkompetitive Hemmung (Abb.48-50), genauso wie $15KPGE_2$ gegenüber NAD bei festem PGE_2 (Abb.51,52). Das Produktinhibitionsmuster und die Inhibitorkonstanten der Produkte der Hinreaktion sind in Tab.16,17 zusammengefaßt.

Bei der $15KPGE_2$/NAD-Hemmung (PGE_2 fest) rückt der Schnittpunkt der Primärdiagramme mit der Erhöhung der festen PGE_2-Konzentration von der Ordinate weg: die Abszissenabschnitte $[NAD]_{SP}^{-1}$ betragen $4.3mM^{-1}$ (0.01mM PGE_2, Abb.52a), 17.8 mM^{-1} (0.05mM PGE_2, Abb.51) und $29mM^{-1}$ (0.3mM PGE_2, Abb.52b). Trägt man die reziproken Abszissenabschnitte gegen $(1 + K_m^{15KPGE2}K_s^{NADH}[PGE_2] / K_s^{15KPGE2}K_m^{NADH}K_m^{PGE2})^{-1}$ auf (vgl. 3.5.3.), so erhält man für die PGE_2-Konzentrationen von 0.01 und 0.05mM im Rahmen der Bestimmungsgenauigkeit eine Gerade, die durch den Ursprung geht (nicht gezeigt). Der Wert für 0.3mM PGE_2 liegt nicht auf dieser Geraden.

Alle oben beschriebenen Produkthemmungen sind in den für die Inhibitoren verwendeten Konzentrationsbereichen linear: NADH bis 0.064mM, $15KPGF_{2\alpha}$ bis 1.2mM, $15KPGE_2$ bis 0.24mM und $15KPGE_1$ bis 0.25mM. Eine Überprüfung der Linearität der NADH-Hemmung zu höheren Konzentrationen hin mittels eines Dixon-Diagramms (Dixon,1953; Cleland,1970) zeigt eine Abweichung oberhalb von 0.06mM in Gegenwart von 0.2mM NAD und 0.1mM PGE_2 (Abb.53). Entsprechend ergibt $15KPGE_2$ bei 0.1mM PGE_2 eine mindestens bis 0.7mM lineare Hemmung (Abb. 54b), während die Hemmung in Gegenwart von 0.025mM PGE_2 oberhalb von 0.35mM $15KPGE_2$ nicht mehr linear zu sein scheint (Abb.54a). Das alternative Produkt $15K13,14DPGF_{2\alpha}$ zeigt eine nichtkompetitive Hemmung gegenüber $PGF_{2\alpha}$ (Abb. 55) mit einer Inhibitorkonstanten, die derjenigen von $15KPGF_{2\alpha}$ gleicht (Tab.17).

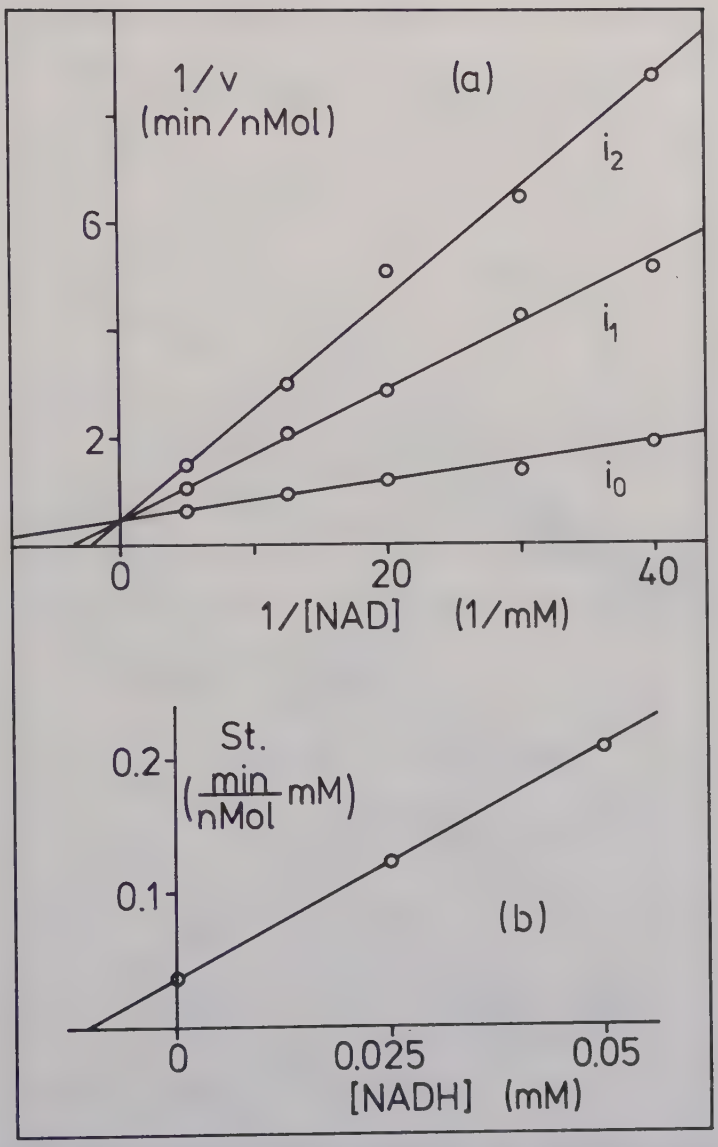

Abb.45 NADH-Hemmung der Hinreaktion bei variablem NAD und festem PGF2α. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 0.2mM PGF2α, 0.25-0.2mM NAD; 0(i0), 0.025(i1) und 0.05(i2)mM NADH; Phenyl-Seph.-Pool. (a): Primärdiagramm. (b): Sekundärdiagramm Steigungen (St.) gegen NADH-Konzentration.

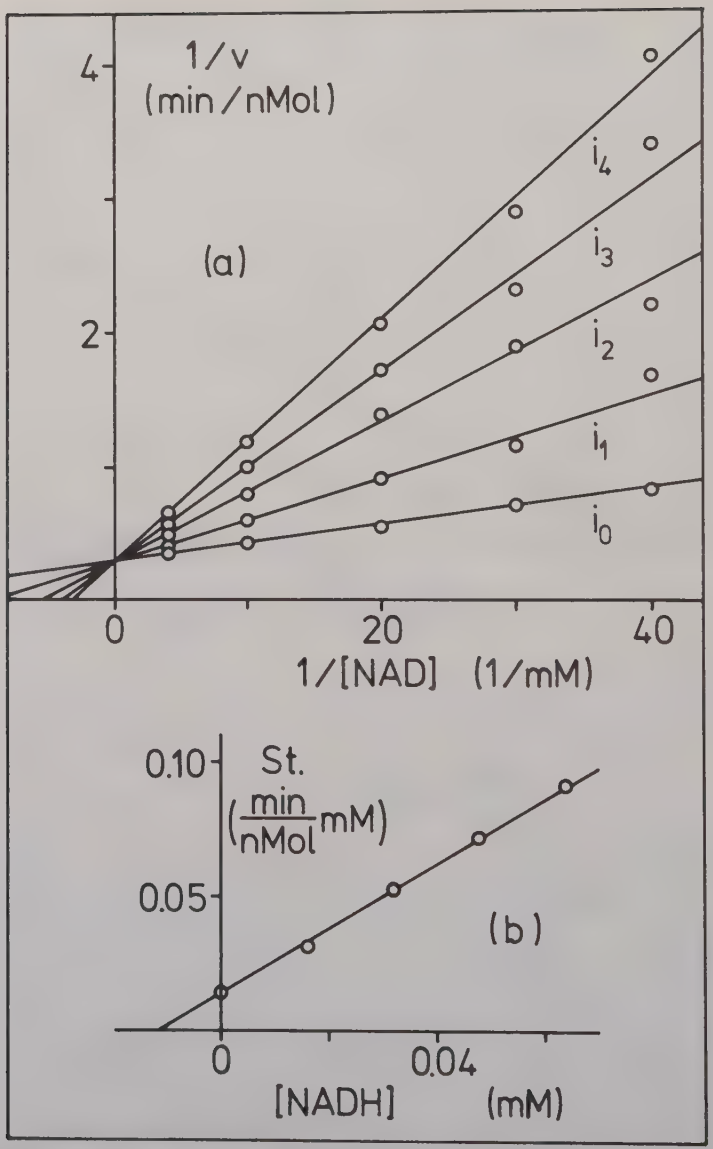

Abb.46 NADH-Hemmung der Hinreaktion bei variablem NAD und festem PGE1. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 0.1mM PGE1, 0.025-0.25mM NAD; 0(i0), 0.016(i1), 0.032(i2), 0.048(i3) und 0.064(i4)mM NADH; A-50-Pool D. (a): Primärdiagramm. (b): Sekundärdiagramm Steigungen (St.) gegen NADH-Konzentration.

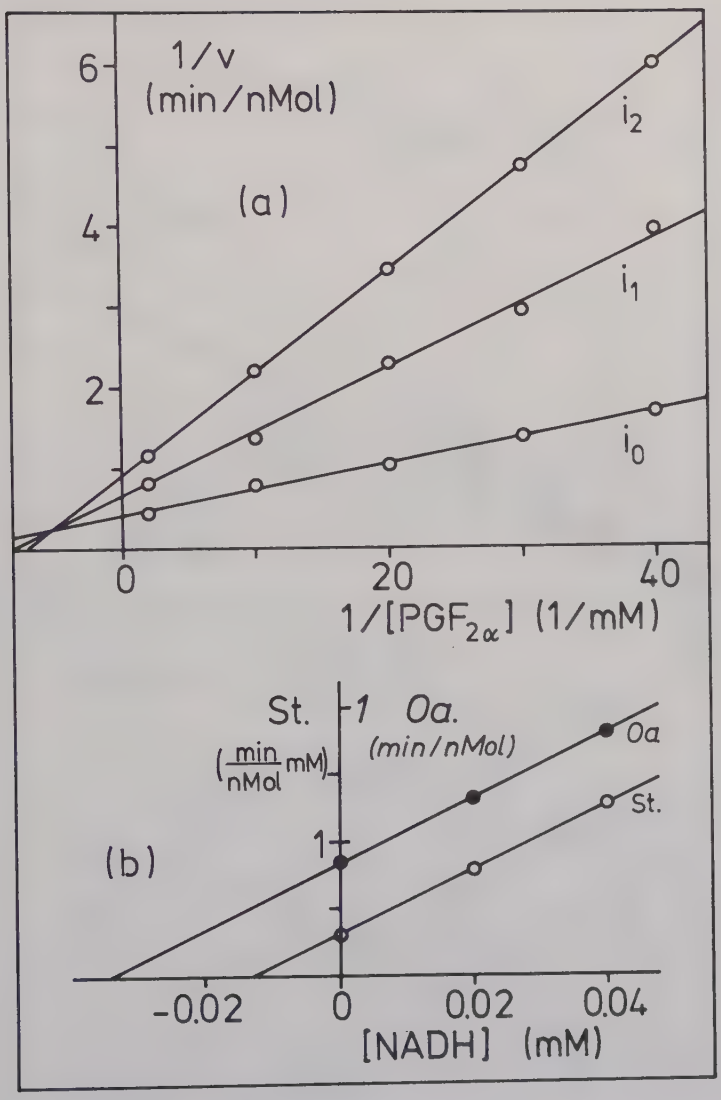

Abb.47 NADH-Hemmung der Hinreaktion bei variablem PGF2α und festem NAD. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 0.1mM NAD. 0.025-0.5mM PGF2α; 0(i0), 0.02(i1) und 0.04(i2)mM NADH; Phenyl-Seph.-Pool. (a): Primärdiagramm. (b): Sekundärdiagramme Ordinatenabschnitte (Oa.) und Steigungen (St.) gegen NADH-Konzentration.

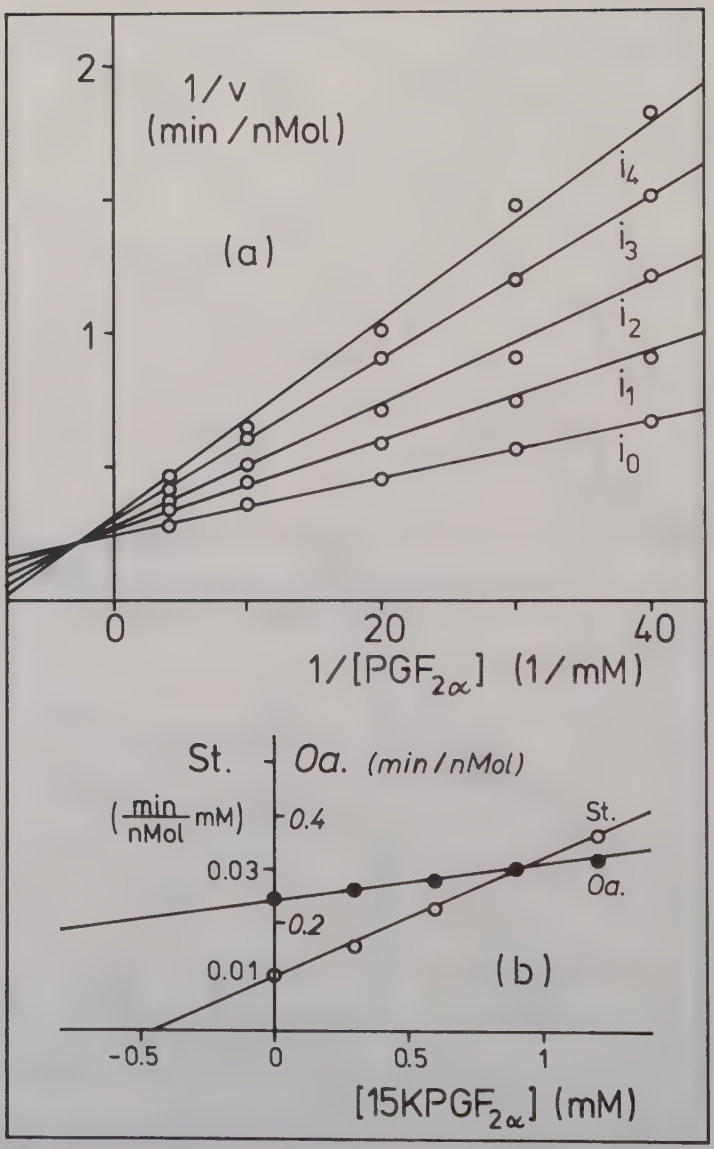

Abb.48 15KPGF2α-Hemmung der Hinreaktion bei variablem PGF2α und festem NAD. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 1mM NAD, 0.025-0.25mM PGF2α; 0(i0), 0.3(i1), 0.6(i2), 0.9(i3) und 1.2(i4)mM 15KPGF2α; A-50-Pool D. (a): Primärdiagramm. (b): Sekundärdiagramme Ordinatenabschnitte (Oa.) und Steigungen (St.) gegen Inhibitor-Konzentration.

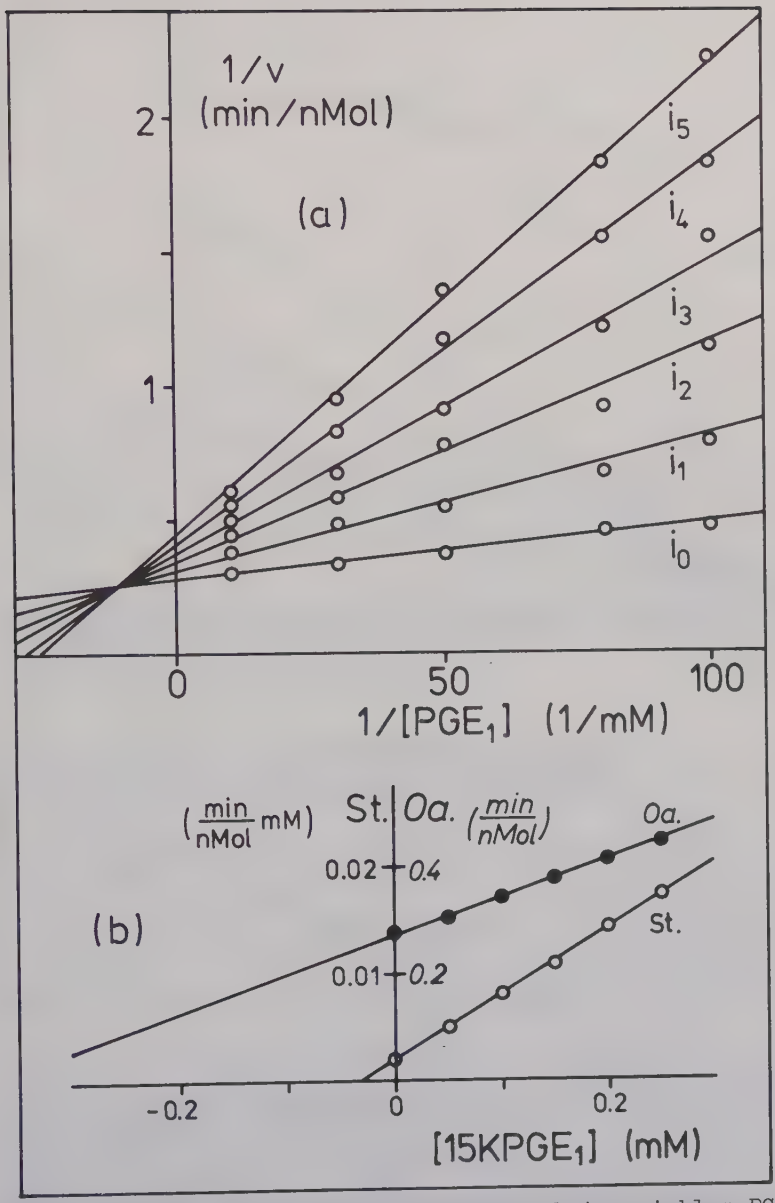

Abb.49 15KPGE1-Hemmung der Hinreaktion bei variablem PGE1 und festem NAD. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 1mM NAD, 0.01-0.1mM PGE1; 0(i0), 0.05(i1), 0.1(i2), 0.15(i3), 0.2 (i4) und 0.25(i5)mM 15KPGE1; A-50-Pool D, 0.2% Äthanol. (a) und (b) siehe Abb.48.

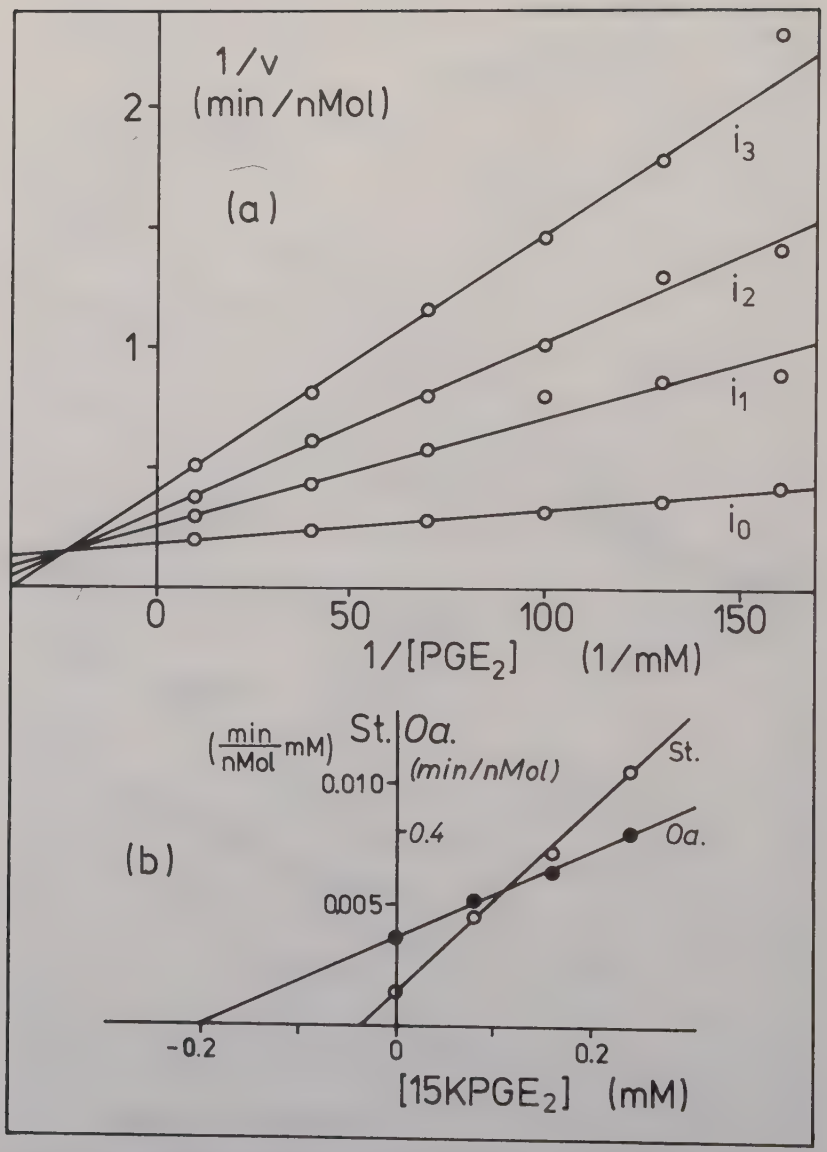

Abb.50 15KPGE2-Hemmung der Hinreaktion bei variablem PGE2 und festem NAD. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 2mM NAD, 0.0063-0.1mM PGE2; 0(i0), 0.08(i1), 0.16(i2) und 0.24(i3) mM 15KPGE2; A-50-Pool I. (a) und (b) siehe Abb.48.

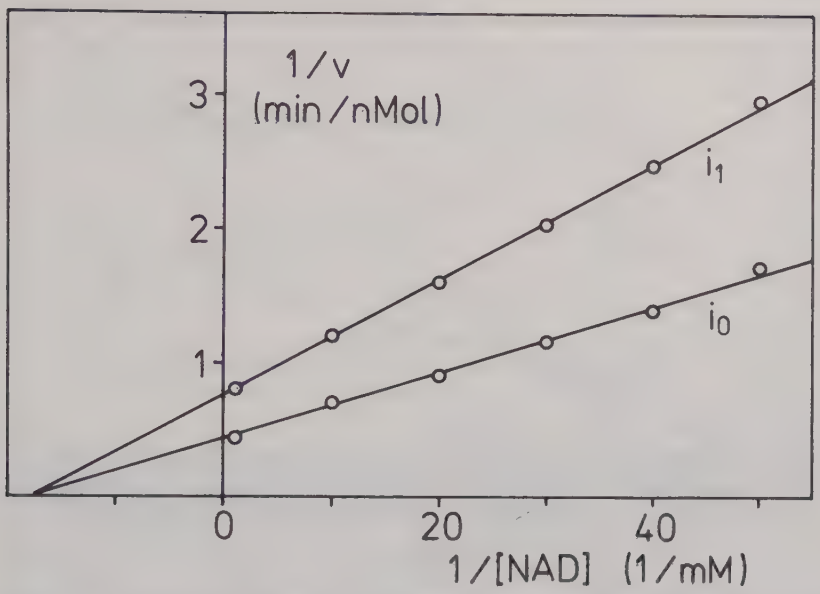

Abb.51 Primärdiagramm der 15KPGE2-Hemmung der Hinreaktion bei variablem NAD und festem PGE2 (0.05mM). Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 0.02-1mM NAD; 0(i0) und 0.16(i1)mM 15KPGE2, A-50-Pool II als Enzymlösung.

Tab.16 Produktinhibitionsmuster der Hinreaktion

Hemmendes Produkt	NAD variabel	PG variabel
NADH	kompetitiv	nichtkompetitiv
$15KPGF_{2\alpha}$	nichtkompetitiv	nichtkompetitiv
$15KPGE_2$		nichtkompetitiv
$15KPGE_1$		nichtkompetitiv

Abb.52 15KPGE2-Hemmung der Hinreaktion bei variablem NAD und festem PGE2. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 0.02-0.5mM NAD, A-50-Pool I. (a): Primärdiagramm für 0.01mM PGE2 und 0(i0), 0.02(i1) bzw. 0.04(i2)mM 15KPGE2. (b): Primärdiagramm für 0.3mM PGE2 und 0(i0), 0.125(i1) bzw. 0.25(i2)mM 15KPGE2. (c): Sekundärdiagramme zu (a) Ordinatenabschnitte (Oa., min/nMol) und Steigungen (St., minxmM/nMol) gegen 15KPGE2-Konzentration. (d): Sekundärdiagramme zu (b).

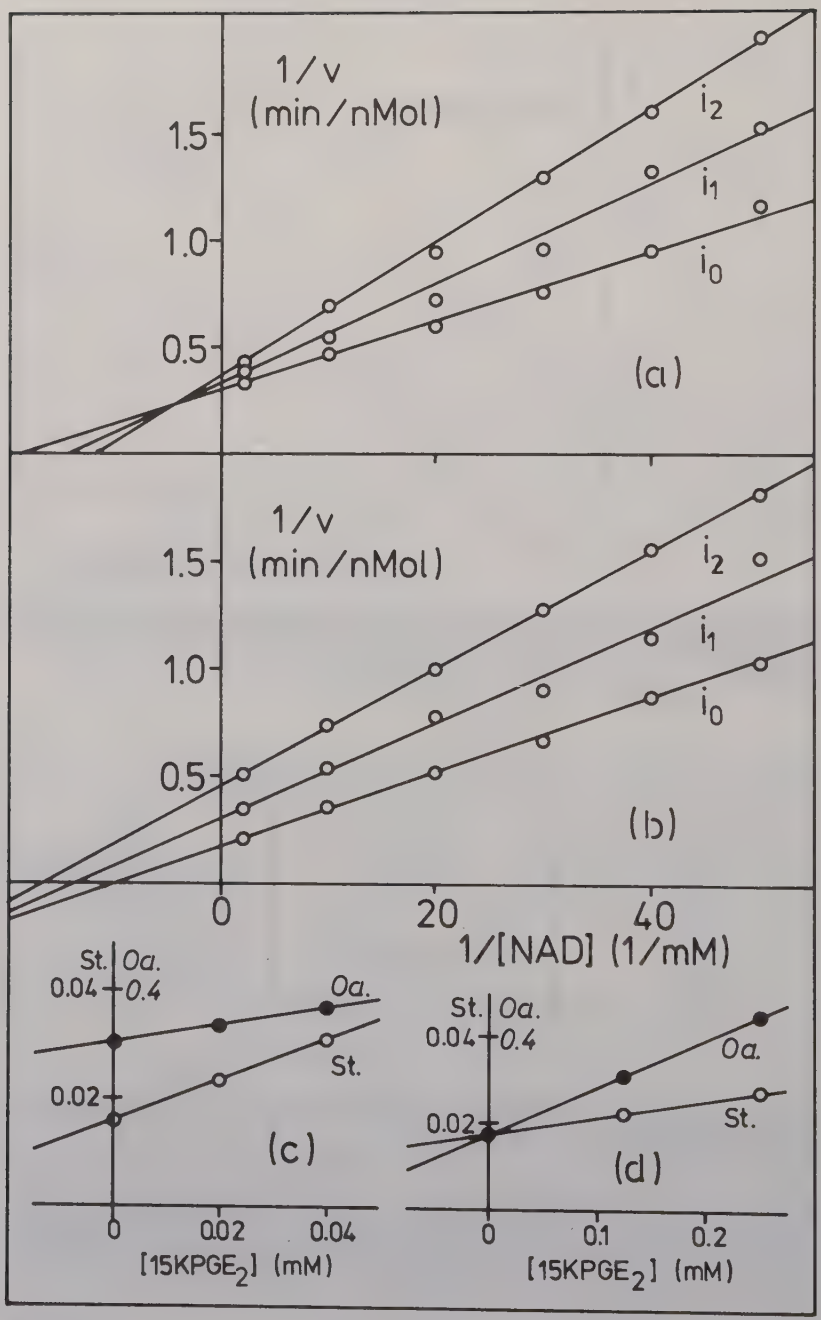
1/v
(min/nMol)
1.5
1.0
0.5
i_2
i_1
i_0
(a)
1/v
(min/nMol)
1.5
1.0
0.5
i_2
i_1
i_0
(b)
0
20
40
1/[NAD] (1/mM)
St.
Oa.
0.04
0.4
Oa.
St.
0.02
(c)
0
0.02
0.04
[15KPGE$_2$] (mM)
St.
Oa.
0.04
0.4
Oa.
St.
0.02
(d)
0
0.1
0.2
[15KPGE$_2$] (mM)

Abb.52

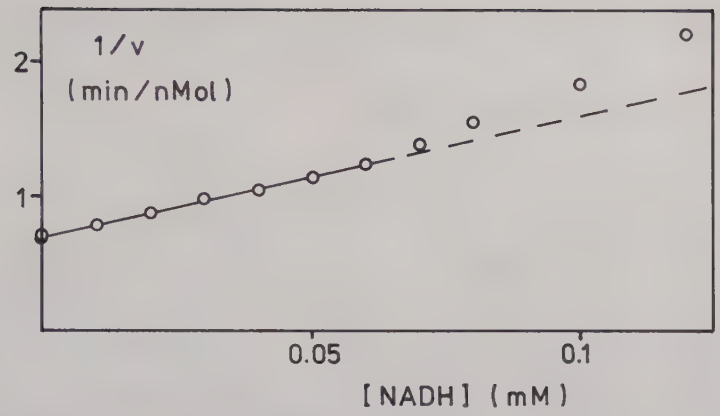

Abb.53 Dixon-Diagramm der NADH-Hemmung der 15HPGDH-Hinreaktion bei festem NAD und PGE2. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 0.2mM NAD, 0.1mM PGE2, 0-0.12mM NADH, A-50-Pool II.

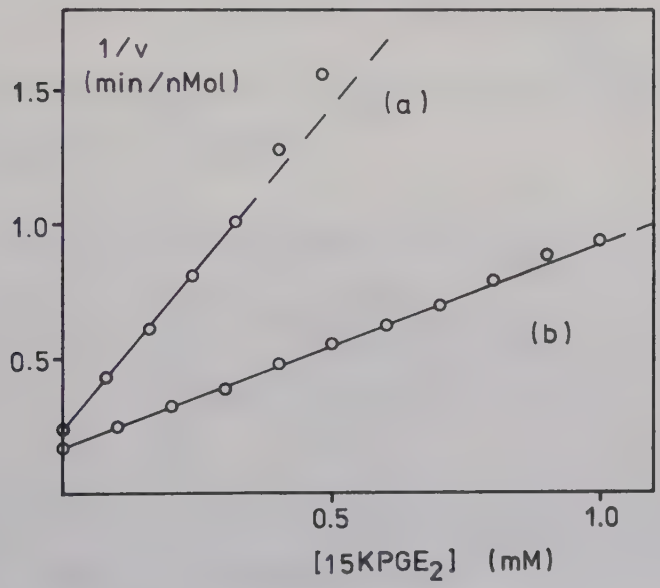

Abb.54 Dixon-Diagramme der 15KPGE2-Hemmung der 15HPGDH-Hinreaktion bei festem NAD und PGE2. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, A-50-Pool I. (a): 2mM NAD, 0.025mM PGE2, 0-0.48mM 15KPGE2. (b): 2mM NAD, 0.1mM PGE2, 0-1mM 15KPGE2.

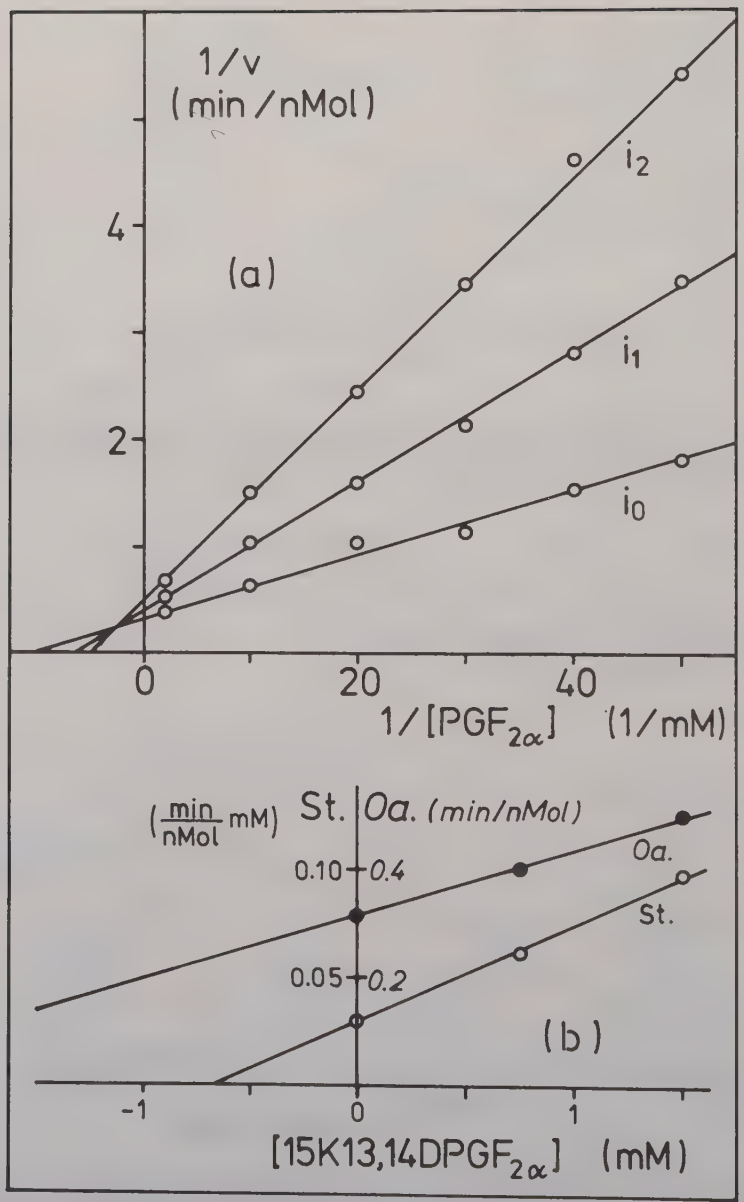

Abb.55 Hemmung der Hinreaktion durch das alternative Produkt 15K13,14DPGF2α bei variablem PGF2α und festem NAD. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 2mM NAD, 0.02-0.5mM PGF2α; 0(i0), 0.75(i1) und 1.5(i2)mM 15K13,14DPGF2α; A-50-Pool I. (a) und (b) siehe Abb. 48.

Tab.17 Hemmkonstanten der 15HPGDH-Hinreaktion. Die Meßreihen wurden graphisch manuell ausgewertet und die Konstanten nach 3.5.3. ermittelt.

	zur Messung verwendete Enzymfraktion	K_i^{NADH} (µM)	K_{i0a}^{15KPG} (µM)	K_{iSt}^{15KPG} (µM)	K_i^{15KPG} (µM)
$15KPGF_{2\alpha}$	Phenyl-Seph.-Pool/ A-50-Pool D	10	3340	450	3200
$15KPGE_2$	A-50-Pool II/I	12	205	36	200
$15KPGE_1$	A-50-Pool D	12	378	33	360
$15K13,14\ DPGF_{2\alpha}$	A-50-Pool I	-	2650	670	2600

4.6. STEADY-STATE-UNTERSUCHUNGEN ZUR RÜCKREAKTION EINER 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE

Ausführliche Untersuchungen zur 15HPGDH-Rückreaktion wurden in unserer Arbeitsgruppe mit dem hier beschriebenen A-50-Pool II im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt (Baier,1977). Hier sind deswegen nur einige ergänzende Ergebnisse kurz dargestellt.

4.6.1. Vorversuche

Die Zeit/Umsatzkurven der Rückreaktionsmessungen hatten einen relativ kurzen linearen Bereich, genügten aber der Voraussetzung für Steady-State-Bedingungen von Cleland (1970). In 100mM TRAP bei pH 7.4 zeigte NADH in Gegenwart von 0.05, 0.1 und 0.5mM $15KPGE_1$ eine Substrathemmung oberhalb von 0.05mM NADH. Der $K_m^{15KPGE1}app$ (0.05mM NADH) betrug ca. 0.05 mM. Auch $15K13,14DPGF_{2\alpha}$ erwies sich als Substrat der Rückreaktion mit einem $K_m app$ (0.05mM NADH, 100mM TRAP, pH 7.4) von ca. 0.4mM. Unter den angegebenen Bedingungen war die relative Maximalgeschwindigkeit mit $15KPGE_1$ ca. sechsfach höher als mit $15K13,14DPGF_{2\alpha}$.

4.6.2. Anfangsgeschwindigkeitsmuster der Rückreaktion

Die Testbedingungen zur Messung der NADH/$15KPGE_2$-Kreuz-

serie entsprachen denen der Hinreaktionskinetiken. Das im Rahmen des Meßfehlers lineare Primärdiagramm 1/v gegen reziproke 15KPGE$_2$-Konzentrationen ist in Abb.56 dargestellt. Die Geraden 1-6 (0.005-0.048mM NADH) zeigen einen gemeinsamen Schnittpunkt im zweiten Quadranten. Durch diesen Schnittpunkt gehen die Geraden 7 und 8 (0.087 bzw. 0.217mM NADH) nicht. Das Sekundärdiagramm "Ordinatenabschnitte gegen reziproke NADH-Konzentration" ist linear (Abb.57a), während das Sekundärdiagramm der Steigungen bei höheren NADH-Konzentrationen von der Linearität abweicht und ein Minimum bei ca. 55µM NADH aufweist (Abb.57b). Unter der Annahme einer kompetitiven Substrathemmung durch NADH im Rahmen eines Ordered Bi Bi Mechanismus lassen sich folgende Konstanten ermitteln (3.6.2.): V_2 = 2.9nMol/min = V_1 (NAD/PGE2) (innerhalb der Meßgenauigkeit), $K_m^{15KPGE2}$ = 35µM, $K_s^{15KPGE2}$ = 210µM, K_m^{NADH} = 1.3µM und K_s^{NADH} = 9µM. Die Hemmkonstante für die Substrathemmung durch NADH wurde nach Segel (1975) zu ca. 350µM abgeschätzt.

4.6.3. Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten

Aus den bei pH 7.4 ermittelten kinetischen Konstanten der Hin- und Rückreaktion läßt sich nach Cleland (1963a) gemäß 3.6.3. für einen Ordered Bi Bi Mechanismus der Bisubstratreaktion NAD + PG $\rightleftharpoons$ NADH + 15KPG eine Gleichgewichtskonstante (K_{eq}) von ca. 0.7 für PGE_2 und NAD als Substrate errechnen. Entsprechend kann für $PGF_{2\alpha}$ unter Hinzuziehung der von Baier (1977) für die NADH/15KPGF$_{2\alpha}$-Rückreaktion ermittelten Werte K_{eq} = 1.5 errechnet werden.

Abb.56 Primärdiagramm der Rückreaktion "1/v gegen reziproke 15KPGE2-Konzentration" bei festem, variablem NADH. Testbdgn.: 100mM TRAP, pH 7.4, 0.02-0.1mM 15KPGE2; 0.005(1), 0.0063(2), 0.01(3), 0.021(4), 0.027(5), 0.048(6), 0.087(7), und 0.217(8)mM NADH; A-50-Pool II. Zur Erhöhung der Übersichtlichkeit erfolgte eine Aufteilung in drei Unterdiagramme.

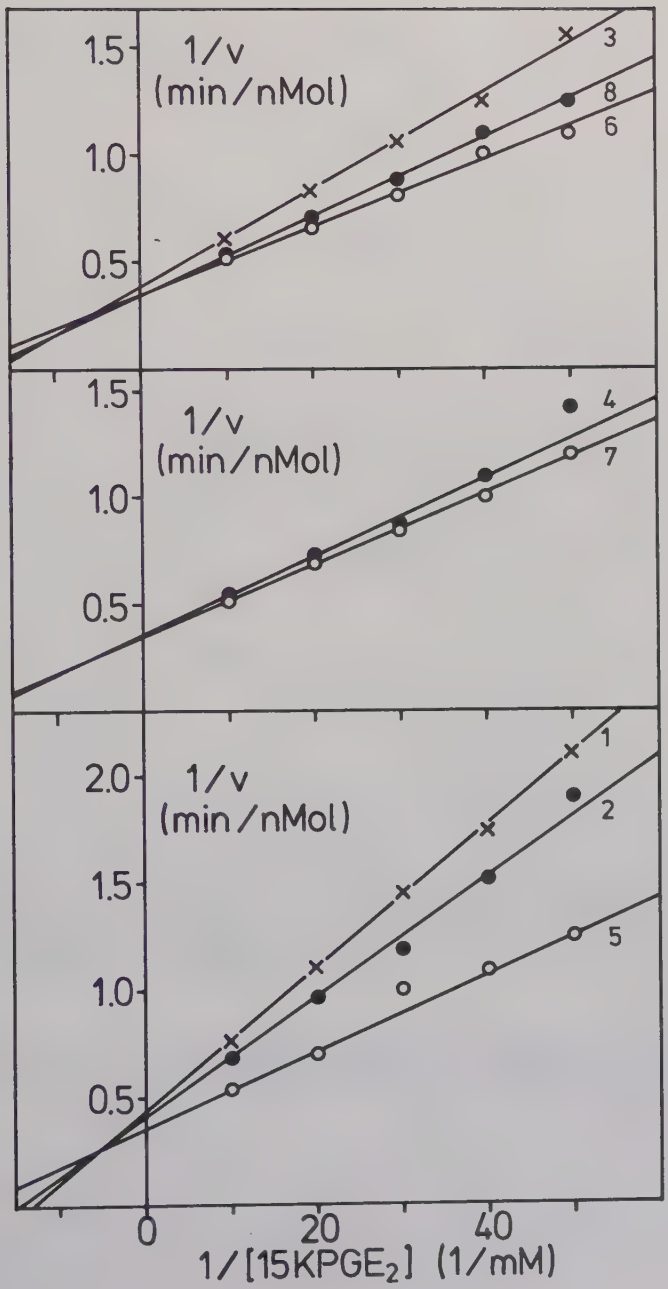
1.5
1.0
0.5
1/v
(min/nMol)
3
8
6
1.5
1.0
0.5
1/v
(min/nMol)
4
7
2.0
1.5
1.0
0.5
1/v
(min/nMol)
1
2
5
0
20
40
1/[15KPGE2] (1/mM)

Abb.56

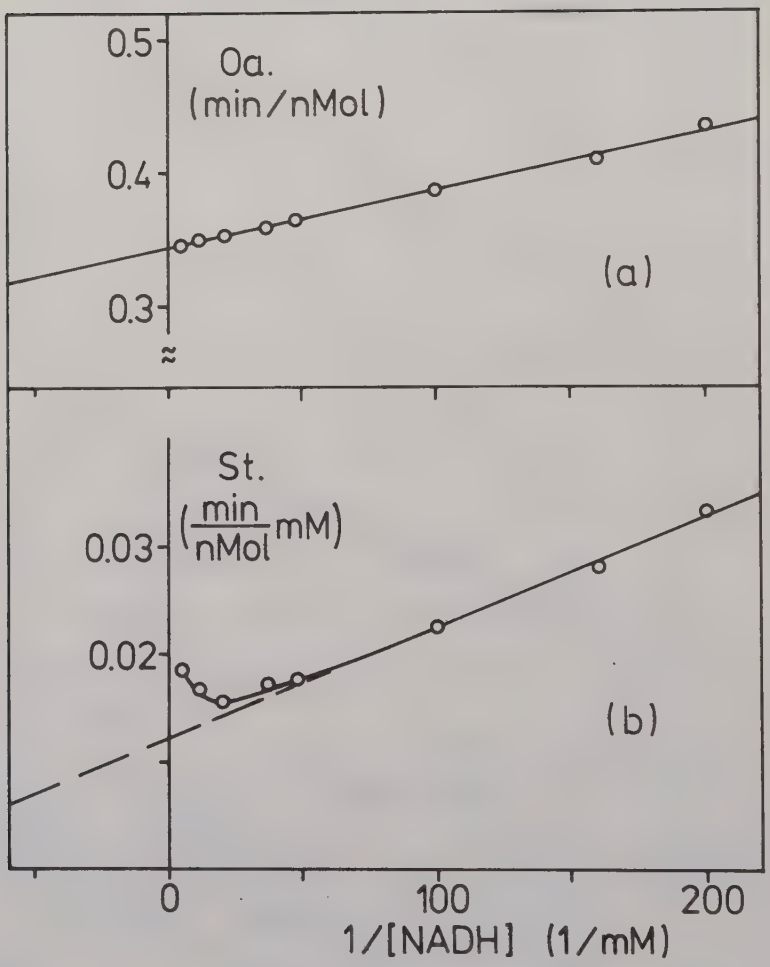

Abb.57 Sekundärdiagramme zu Abb.56. (a): Ordinatenabschnitte (Oa.) und (b): Steigungen (St.) gegen reziproke NADH-Konzentrationen.

Unter Einbeziehung der Wasserstoffionenkonzentration bei pH 7.4 erhält man daraus für die Gleichung $NAD^+ + PG \rightleftharpoons NADH + H^+ + 15KPG$ eine Gleichgewichtskonstante von ca. 28nM für PGE_2 und ca. 60nM für $PGF_{2\alpha}$.

Nach Cleland (1963a) kann man aus den in dieser Arbeit und von Baier (1977) vorgelegten kinetischen Konstanten die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Schritte der 15HPGDH-Reaktion unter den gegebenen Bedingungen (100mM TRAP, pH 7.4, 37°C) für E_2 und $F_{2\alpha}$ errechnen. Dabei wird von einem Ordered Bi Bi Mechanismus mit NAD (bzw.NADH) als führendem Substrat ausgegangen. Die Relationen der Maximalgeschwindigkeiten in beiden Richtungen betragen ca. $V_1^{E2} = V_2^{E2} = V_1^{F2\alpha} = 1.3\ V_2^{F2\alpha}$ (vgl. auch Baier,1977). Durch die z.T. relativ großen Standardabweichungen der kinetischen Konstanten sind die errechneten Geschwindigkeitskonstanten mit einem hohen Fehler behaftet. Um diesen durch die Unsicherheit bezüglich der spezifischen Aktivität, des Molekulargewichts und der Anzahl der aktiven Zentren pro Molekül des "reinen" Enzyms nicht weiter zu vergrößern, erfolgt die Angabe der Werte als Vielfache der Wechselzahl der Hinreaktion V_1/E_t.

E_2: $k_1 = 25mM^{-1}V_1/E_t$, $k_2 = 3.9V_1/E_t$, $k_3 = 770mM^{-1}V_1/E_t$,
$k_4 = 1.4V_1/E_t$, $k_5 = 1.2V_1/E_t$, $k_6 = 53mM^{-1}V_1/E_t$,
$k_7 = 7.4V_1/E_t$, $k_8 = 740mM^{-1}V_1/E_t$.

$F_{2\alpha}$: $k_1 = .24mM^{-1}V_1/E_t$, $k_2 = 3V_1/E_t$, $k_3 = 30mM^{-1}V_1/E_t$,
$k_4 = V_1/E_t$, $k_5 = 2.5V_1/E_t$, $k_6 = 5.4mM^{-1}V_1/E_t$,
$k_7 = 1.7V_1/E_t$, $k_8 = 110mM^{-1}V_1/E_t$.

5. DISKUSSION

5.1. NAD-ABHÄNGIGE 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE IN HUMANPLACENTA UND IHRE ISOLIERUNG

NAD-abhängige 15HPGDH, die den ersten Schritt des Hauptabbauweges der PG E, F und A katalysiert, kommt in fast allen untersuchten Säugetiergeweben vor, wenn auch meist in sehr geringen Konzentrationen (Änggard,1971; Marrazzi & Andersen,1974). Relativ hohe Konzentrationen des Enzyms wurden in Lunge, Niere, Fettgewebe, Milz und Duodenum ermittelt (Änggard et al.,1971; Sun et al.,1976). Im reproduktiven System der Schwangeren ist die Placenta der Hauptplatz der PG-Inaktivierung, und in Homogenaten reifer Humanplacenten sowie der Eihäute wurden bisher auch mit die höchsten Gewebskonzentrationen der 15HPGDH gefunden (Jarabak,1972; Keirse & Turnbull,1975). Allerdings schwanken die Enzymaktivitäten von Placenta zu Placenta stark (Keirse et al., 1976).

Entsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit eine hohe Standardabweichung der 15HPGDH-Gesamtaktivitäten in 17000xg -Überständen von Homogenaten sieben reifer Humanplacenten erhalten ((34000 $\pm$ 6000)mIU; vgl. 4.2.1.). Unter Berücksichtigung der bei der Aufarbeitung erhaltenen Verluste läßt dieser Wert darauf schließen, daß die 15HPGDH-Gesamtaktivität der Placenten zwischen 35000 und 55000mIU schwankt. Dies entspricht, wenn man von einer spezifischen Aktivität des "reinen" Enzyms von 43000mIU ausgeht (s.u.), ca. 1mg Enzymprotein oder anders ausgedrückt ca. 20nMol 15HPGDH pro reifer Humanplacenta.

Die erste Anreicherung einer 15HPGDH wurde von Änggard & Samuelsson (1966) aus Schweinelunge vorgenommen. Mitte des Jahres 1974 waren erst zwei teilweise Isolierungen des Enzyms aus reifer Humanplacenta publiziert, die zu einer 19- (Jarabak,1972) bzw. 108-fachen (Schlegel et al.,1974) Anreicherung, bezogen auf die Zentrifugationsüberstände der Placentahomogenate, geführt hatten. Im Hinblick auf die geplanten kinetischen Untersuchungen und eine bessere

Charakterisierung des Enzyms erschien eine weitergehende Isolierung sinnvoll.

Im Rahmen der Isolierung II wurde eine 15HPGDH aus reifer Humanplacenta, bezogen auf den 17000xg-Überstand, fast 10000-fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 43000 mIU/mg Protein angereichert, wobei eine Ausbeute von 10% erzielt wurde. Diese Werte halten einem Vergleich mit inzwischen von anderen Gruppen veröffentlichten verbesserten Isolierungen durchaus stand.

Schlegel & Greep (1975) erhielten unter Einschluß einer isoelektrischen Fokussierung eine ca. 1300-fache Anreicherung, jedoch wurde bei diesem Schritt soviel 15HPGDH inaktiviert, daß daraus nur eine 0.1%ige Gesamtausbeute resultierte. Braithwaite & Jarabak (1975) erzielten bei einer 915-fachen Anreicherung und einer Ausbeute von 3.7% eine spezifische Aktivität von 1765nMol/min x mg, die selbst unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Testbedingungen (vgl. 4.4.3. und 4.4.4.) höchstens 3000mIU/mg Protein betragen dürfte. Ihre Enzympräparation erwies sich auf analytischen Disk-Elektrophoresen und SDS-Elektrophoresen als homogen. Dies ist insofern erstaunlich, als sowohl die A-50-Pools I und II (Tab.4) als auch die von einer französischen Gruppe aus Humanplacenta isolierten Enzympräparationen (Thaler-Dao et al.,1974; Saintot et al.,1976), die vergleichbare bis doppelte spezifische Aktivitäten besaßen, stets noch mindestens zwei Fremdproteinbanden in analytischen Disk-Elektrophoresen aufwiesen. Abgesehen von Braithwaite & Jarabak (1975) wurde bisher von keinem Autor die Reinigung einer 15HPGDH bis zur Homogenität berichtet, auch nicht aus anderen Geweben. Eine Übersicht über 15HPGDH -Isolierungen wurde von Hansen (1976) zusammengestellt. Die bei Isolierungen aus anderen Geweben erreichten spezifischen Aktivitäten liegen unter den zuletzt für das Humanplacentaenzym angegebenen.

Die beste Anreicherung bei einem Einzelschritt wurde während der Gelfiltration über Sephadex G-100 mit 11 bzw. 13

erzielt. Die entscheidende Neueinführung bei der Isolierung II war die Chromatographie über Phenyl-Sepharose CL-4B, die zu einer weiteren 10-fachen Anreicherung der bereits hochgereinigten 15HPGDH-Präparation führte. Der Phenyl-Seph.-Pool (Tab.4), der mit 43000mIU eine um ca. eine Zehnerpotenz höhere spezifische Aktivität als die bisher beschriebenen besten 15HPGDH-Präparationen aufwies, zeigte nur eine Proteinbande in analytischen Disk-Elektrophoresen bei zwei verschiedenen Geldichten. Die Proteinbande korrespondierte mit einer entsprechenden 15HPGDH-Aktivitätsanfärbung. Abb.7 zeigt außerdem die Abtrennung der beiden Hauptproteinbanden des A-50-Pools II während der Phenyl-Sepharose-Chromatographie. Allerdings war die Proteinanfärbung der Bande des Phenyl-Seph.-Pools wegen der geringen Proteinkonzentration zu schwach, um als Beweis dafür zu gelten, daß diese 15HPGDH-Präparation frei von Fremdproteinen war. Versuche, diese Enzymlösung zu konzentrieren, waren nicht erfolgreich. Selbst die Einengung mit trockenem Sephadex G-25 coarse, eine Methode, die als besonders schonend für empfindliche Enzyme gilt (Flodin et al.,1960), war hier mit zu hohen Aktivitätsverlusten verbunden.

Alle darauf untersuchten Enzymfraktionen, ein hier nicht näher beschriebener DEAE-Sephadex-A-25-Pool (Jung et al., 1975), die A-50-Pools I und II sowie der Phenyl-Seph.-Pool (Tab.4) zeigten nur eine 15HPGDH-Bande in der Aktivitätsanfärbung von Disk-Elektrophoresen, die allerdings immer wesentlich breiter als die korrespondierende Proteinanfärbung war. Dies könnte auf einer Diffusion des Enzymproteins während des einstündigen Verweilens im Inkubationsansatz der Aktivitätsanfärbung bei 37°C beruhen. In Übereinstimmung damit fanden Braithwaite & Jarabak (1975) keine Hinweise für die Existenz von Isoenzymen der 15HPGDH in Humanplacenta, während andere Autoren je nach Präparation eine oder zwei aktive 15HPGDH-Banden in ihren Disk-Elektrophoresen fanden (Thaler-Dao et al.,1974; Schlegel et al., 1974; Schlegel & Greep,1975). Erstaunlicherweise schliessen Hassid & Levine (1977) aus einem ungewöhnlich breiten

Aktivitätspeak in einer analytischen isoelektrischen Fokussierung auf multiple Formen der 15HPGDH aus Hühnerniere. Während also die Frage, ob Isoenzyme der 15HPGDH existieren, noch offen bleibt, kann davon ausgegangen werden, daß die A-50-Pools I und II und der Phenyl-Seph.-Pool nur eine 15HPGDH enthielten.

In diesem Zusammenhang erscheint erwähnenswert, daß durch die Perfusion der reifen Humanplacenta und die Homogenisierung und Zentrifugation unter leicht hypertonen Bedingungen große Teile der Blut- und hier besonders der Erythrozytenproteine sowie der Proteine einiger Zellorganellen des Placentagewebes entfernt werden. Der Effekt der Perfusion, die bisher nur in unserer Gruppe durchgeführt wird, kann am besten durch einen Vergleich hier erhaltener Durchschnittswerte von sieben Zentrifugationsüberständen aus Humanplacentahomogenaten mit den Werten von Schlegel et al. (1974) verdeutlicht werden. Deren Bedingungen kommen den hier verwendeten am nächsten. Ein signifikanter Aktivitätsverlust während der Perfusion kann ausgeschlossen werden, weil die durchschnittliche Gesamtaktivität von (34 $\pm$ 6)IU über der von den genannten Autoren erhaltenen liegt. Die starke Reduzierung des Gesamtproteins durch die Perfusion drückt sich in dem aus vergleichbaren Placentagewebsmassen erhaltenen Gesamtprotein von (5.8 $\pm$ 1)g gegenüber ca. 20g (hochgerechnet) aus. Daraus resultiert eine relativ hohe spezifische Aktivität von (5.9 $\pm$ 1.7)mIU/mg Protein in den als Bezugspunkt der Anreicherung dienenden 17000xg-Überständen. Die hier angegebenen Gesamtanreicherungen sind also gegenüber solchen unterbewertet, die als Bezugspunkt einen ohne Perfusion erhaltenen Zentrifugationsüberstand oder direkt das Homogenat verwenden.

Die Nützlichkeit der Verwendung von Glycerin zur Stabilisierung der 15HPGDH aus Humanplacenta während der Isolierung ist unbestritten (Jarabak,1972; Rückrich,1974). SH-Schutzreagenzien wurden zunächst nicht benutzt. Ihr günstiger Effekt, wenn sie zusätzlich zu Glycerin eingesetzt werden, ist inzwischen aber nachgewiesen (Rückrich,1974). Bei

einem Vergleich der Ausbeuten der Isolierungen I und II (Tab.1,2) scheint 5-10mM ME der Verwendung von 0.5mM DTE überlegen zu sein. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß bei der Isolierung I mehr auf Ausbeute und bei der Isolierung II mehr auf gute Anreicherung geachtet wurde. Zusätzlich zu Glycerin und SH-Schutzreagenzien kann während einer 15HPGDH-Isolierung auch der stabilisierende Effekt von NAD ausgenutzt werden, insbesondere da eine NAD-Konzentration von höchstens 0.4mM ausreichend ist (Tab.7).

5.2. HYDROPHOBE WECHSELWIRKUNGEN DES ENZYMS

Folgende Gründe sprechen dafür, daß es sich bei der sehr effektiven Reinigung der 15HPGDH über Phenyl-Sepharose um eine hydrophobe Chromatographie ("hydrophobic interaction chromatography"; Morris,1976) des Enzyms handelt:

1. Sowohl Phenyl- als auch Octyl-Sepharose CL-4B tragen über stabile Ätherbrücken an den Träger gebundene Wirkgruppen. Sie enthalten nach Aussage des Herstellers keine geladenen Gruppen.
2. Eine "biospezifische" Wechselwirkung von Phenyl- oder Octylgruppen mit dem aktiven Zentrum des Enzyms sollte nicht erfolgen.
3. Nach Morris (1977) ist ein wichtiges Kriterium für das Vorliegen einer hydrophoben Wechselwirkung die Bindung an das Säulenmaterial bei relativ hohen und die Elution bei niedrigen Salzkonzentrationen. 15HPGDH aus Humanplacenta bindet bei hohen (2M Ammoniumsulfat u.a., Baier,1977; 0.2M KP u.a., Schärfe,1977) und mittleren Ionenstärken (0.02M KP, Abb.6) an Phenyl-Sepharose CL-4B. Die Elution erfolgt im absteigenden Phosphatgradienten ab ca. 3mM KP/1mM EDTA/ 0.5mM DTE (Abb.6), wobei die Hydrophobizität des Elutionspuffers durch 50% Glycerin erhöht ist (vgl. Rosengren et al.,1975).
4. Das Enzym wird sogar von 1mM EDTA/0.5mM DTE/50% Glycerin nicht von Octyl-Sepharose CL-4B eluiert, sondern kann erst unter dem Zusatz von Triton X-100 von dieser verdrängt werden (4.2.3.). Daraus kann man nach Shaltiel (1974) schließen, daß es fester an Octyl- als an Phenyl-

Sepharose CL-4B bindet. Nach Rosengren et al. (1975) ist aber die hydrophobe Wechselwirkung mit einer Octylgruppe wesentlich stärker als mit einer Phenylgruppe. Diese Ergebnisse machen auch eine für die Bindung entscheidende speziellere Wechselwirkung der π-Elektronensysteme der Phenyl-Sepharose mit denen aromatischer Aminosäuren des Enzymproteins unwahrscheinlich.

Obwohl bislang der Nachweis eines Temperatureffekts auf die Bindung aussteht (vgl. Morris,1977), darf davon ausgegangen werden, daß es sich hier um den typischen Fall einer "hydrophobic interaction chromatography" handelt. Ausserdem lassen die Elutionsbedingungen des Enzyms von beiden Säulenmaterialien darauf schließen, daß 15HPGDH aus Humanplacenta in der Lage ist, starke hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen. Dies dürfte auf relativ große hydrophobe Bereiche an der Oberfläche des Enzymproteins zurückzuführen sein (Shaltiel,1974; Morris,1976).

Über solche hydrophoben Bereiche können auch Lipide und Detergenzien mit dem Enzym in Wechselwirkung treten und dabei seine Aktivität beeinflussen. Die Effekte verschiedener Lipide und Detergenzien auf die Anfangsgeschwindigkeit der 15HPGDH aus Humanplacenta bei pH 7.4, 37°C und fast sättigenden Substratkonzentrationen sind in Tab.8 zusammengefaßt. Während 0.1% (3.5mM) SDS (ionisches Detergenz) zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms im Laufe der fünfminütigen Vorinkubation führen, erhöhen die nichtionischen Detergenzien Triton X-100 und Brij 56 in der Konzentration von 0.1% (ca. 1.5 bzw. 2.5mM)[1)] die Aktivität des hochangereicherten Enzyms um 69 bzw. 40%. Die Konzentrationsabhängigkeit des Tritoneffekts auf die 15HPGDH-Reaktion zeigt unter den in Abb.18 angegebenen Bedingungen eine halbmaximale "Aktivierung" bei 0.008%, einer Konzentration, die im Bereich der kritischen Micellenkonzentration von Triton X-100 liegt (Helenius & Simons,1972;

[1)] Das Molekulargewicht dieser nichtionischen Detergenzien kann nicht genau angegeben werden.

Pinto & Frisell,1975). Eigentlich wirksam sind daher kaum die Tritonmonomeren, sondern eher die Tritonmicellen, sodaß eine spezifische Wechselwirkung im aktiven Zentrum oder an einer zweiten Bindungsstelle weitgehend ausscheidet. Wahrscheinlicher sind hydrophobe Wechselwirkungen mit Bereichen an der Enzymoberfläche. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang, daß Lipo- und Membranproteine erhebliche Mengen Triton zu binden vermögen, während Serumalbumin für Triton X-100 nur vier spezielle Bindungsstellen aufweist und andere hydrophile Proteine keine meßbare Tritonbindung zeigen (Helenius & Simons,1972; Makino et al., 1973). Der Verlauf der in Abb.18 gezeigten Kurve ist sehr ähnlich dem der Tritonaktivierung einer bakteriellen Sarkosin-Dehydrogenase (Pinto & Frisell,1975), die als membranassoziiertes Enzym gilt (Frisell,1971).

Die Lineweaver-Burk-Diagramme der 15HPGDH-Hinreaktion für die Substrate NAD und $PGF_{2\alpha}$ sind in Gegenwart von 0.1% Triton X-100 ebenfalls linear (Abb.18), wobei die Erhöhung der Maximalgeschwindigkeiten mit einer Erhöhung der beiden scheinbaren Michaeliskonstanten verbunden ist (Tab.9). Das gleiche Phänomen stellte auch Gotterer (1967b) bei der Reaktivierung solubilisierter ß-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, die aus der inneren Mitochondrienmembran von Rattenleberzellen stammt, durch gemischte mitochondriale Phospholipide fest: "...as the enzyme became increasingly saturated with lipid there occurred not only an increase in the V_{max}, but also an increase in the K_m for both ß-hydroxybutyrate and NAD. Such findings would indicate that a profound alteration in the catalytic site of the enzyme occurred as the enzyme became activated by lipid". Eine solche Veränderung im katalytischen Zentrum des Enzyms könnte nicht nur die Affinität zu seinen Substraten beeinflussen, sondern auch den Mechanismus der Enzymkatalyse verändern.

Unter den Bedingungen von Tab.8 zeigt die käufliche Membranlipidfraktion "Gangliosidgemisch aus Rinderhirn" (0.05% i.T.) eine 34%ige Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit hochangereicherter 15HPGDH, während L-α-Lecithin

(Dipalmitoylphosphatidylcholin) nur eine 7-17%ige "Aktivierung" hervorruft. Allerdings wurde Lecithin wegen der von ihm verursachten Trübung i.T. nur bis zu einer Konzentration von 1.25×10^{-3}% (0.016mM) eingesetzt. Ferner könnten für seinen geringen Effekt die kurze Vorinkubationszeit von 5min und die Verwendung eines Dipalmitinsäureesters verantwortlich sein. Vorinkubationszeit, Temperatur, Sättigungsgrad und Kettenlänge des Carbonsäurerestes sowie Konzentration des Lecithins haben einen deutlichen Einfluß auf die Aktivität membrangebundener mitochondrialer ATPase und ß-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (Gotterer,1967a; Houslay et al.,1975; Bruni et al.,1975). Solubilisierte ß-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase wird z.B. durch eine dreißigminütige Inkubation bei ca. 30°C mit 0.44-2mM Lecithin aktiviert (Gotterer,1967a; Wilschut et al.,1976). Auf jeden Fall zeigt aber auch der geringe Effekt, daß eine Wechselwirkung zwischen Lecithin und 15HPGDH stattfindet. Auch hier dürften die hydrophoben Bereiche der 15HPGDH eine Rolle spielen, da die Oberfläche von Lecithinvesikeln ebenso wie die der Tritonmicellen unter Testbedingungen ungeladen sind (Bangham & Dawson,1958). Entsprechende hydrophobe Wechselwirkungen wurden auch für ß-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase diskutiert (Gotterer,1967b).

Übrigens läßt sich dieses Enzym durch Detergenzien (Cholat, Lubrol) oder pH-Erhöhung solubilisieren (Menzel & Hammes, 1973; Gotterer,1967a), Verfahren, die auch zur Elution von Proteinen bei der hydrophoben Chromatographie Verwendung finden. Überhaupt sollen bei der Assoziation von Enzymen mit Membranen hydrophobe Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle spielen (Ji & Benson,1968; Hafeti & Hanstein,1969; Braun & Radin,1969). Ein Vergleich der allgemein als cytoplasmatisches Enzym geltenden 15HPGDH aus Humanplacenta (Schlegel et al.,1974) mit membrangebundenen Enzymen erscheint recht verwegen. Es fällt jedoch auf, daß Homogenisierung und anschließende Zentrifugation der Placenten bei niedrigen Ionenstärken und in Gegenwart von 20% Glycerin vorgenommen wurden, Bedingungen, die hydrophobe Wechsel-

wirkungen weit weniger begünstigen als solche, die in der Zelle vorherrschen. Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Eigenschaften dieser 15HPGDH ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß das Enzym in der Zelle über hydrophobe Wechselwirkungen zumindestens zeitweise und vielleicht auch nur lose mit Membranen assoziiert ist. Dies könnte durch eine regulatorische Beeinflussung der Enzymaktivität und die mögliche enge räumliche Beziehung zur PG-Synthetase neue Aspekte bezüglich der Regulation des PG-Spiegels in der Zelle und der Organisation des PG-Systems aufzeigen (vgl. Änggard,1971). Natürlich reichen die vorgelegten Ergebnisse zu einer Untermauerung dieser Hypothese nicht aus. Eine detailliertere Diskussion des Problems sollte erst erfolgen, wenn weitere Daten vorliegen.

Im Rahmen der uteroplacentalen Einheit ist die Frage, ob Gestagene oder Östrogene die 15HPGDH-Aktivität beeinflussen können, von einigem Interesse (Goldberg & Ramwell, 1975). Alam et al. (1976) fanden eine Erhöhung der 15HPGDH-Aktivität in Zentrifugationsüberständen der Deciduahomogenate pseudoschwangerer Ratten durch Progesteron und Östradiol. Allerdings ist zumindestens der Östradioleffekt wegen einer möglichen Verunreinigung durch 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase zweifelhaft. Mit dem Humanplacentaenzym wurde entweder kein Effekt (Braithwaite & Jarabak,1974a) oder eine Hemmung (Schlegel et al.,1974) durch Progesteron bzw. Östradiol gefunden. Thaler-Dao et al. (1974,1976) erhielten mit Progesteron und Östron eine kompetitive (unklare?) Hemmung der enzymatischen Reaktion gegenüber PG und geben je nach Veröffentlichung Hemmkonstanten zwischen 0.06 und 0.1mM an. 0.05mM 17ß-Östradiol führen unter den in Tab.8 beschriebenen Bedingungen zu einer 11%igen Verminderung der 15HPGDH-Reaktionsgeschwindigkeit. Daß der Effekt so gering ist, könnte auf der Verwendung annähernd sättigender Substratkonzentrationen beruhen. Er scheint allerdings nicht sehr spezifisch zu sein, da cis-Androsteron im selben Maß hemmt. Eine nähere Untersuchung, die insbesondere die Überprüfung der Reversibilität der Hemmung

einschließen müßte, ist durch die geringe Löslichkeit der Steroide in wäßrigem Medium stark erschwert. Thaler-Dao et al. (1976) führen als mögliche Erklärung für die Östron- und Progesteron-Hemmung nichtspezifische hydrophobe Wechselwirkungen an der Substratbindungsstelle an.

5.3. MOLEKULARGEWICHT

Die Molekulargewichtsangaben für NAD-abhängige 15HPGDH aus Lungengeweben verschiedener Säugetiere bewegen sich zwischen 20000 und 70000 und wurden von Hansen (1976) zusammenfassend kommentiert. Die folgende Diskussion bleibt auf das Humanplacentaenzym beschränkt. Durch Gelfiltration über Sephadex G-100 nach Andrews (1964) wurde unter den in Abb.8 beschriebenen Bedingungen für das hochangereicherte Enzym ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 52000 ermittelt. Dies stimmt mit dem unter gleichen Bedingungen für eine pH5-Fällung und eine $(NH_4)_2SO_4$-Fällung der 15HPGDH erhaltenen Wert von Baier (1977) überein. Braithwaite & Jarabak (1975) fanden durch Sephadex-G-100-Chromatographie in Gegenwart von 5mM KP / 1mM EDTA / 20% Glycerin / pH 7 das gleiche Molekulargewicht, nachdem sie zunächst eines von 44000 durch Gelfiltration und SDS-Elektrophorese angegeben hatten (Braithwaite & Jarabak,1974b). Jung et al. (1975) erhielten mit Sephadex G-150 in Gegenwart von 50mM TRAP / 100mM NaCl / 0.1mM EDTA / 10mM ME / 10% Glycerin / pH 7.4 ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 32000. Über Polyacrylamid-Disk-Elektrophoresen mit verschiedenen Geldichten wurde ein Wert von 50-55000 ermittelt (Thaler-Dao et al.,1974) und durch SDS-Elektrophorese ein solcher von 42000 (Thaler-Dao et al.,1974; Braithwaite & Jarabak,1975).

Die vorliegenden Daten ergeben ein verwirrendes Bild. Einigkeit dürfte darüber bestehen, daß in Gegenwart ausreichend stabilisierender Glycerinkonzentrationen (20-30%) 15HPGDH aus Humanplacenta bei der Gelfiltration ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 52000 zeigt. Dies unabhängig davon, welche Reinigungsstufe des Enzyms und welche Ionenstärke des Puffers eingesetzt wird. Der Wert wird

auch durch die Methode der Geldichtevariation bei Disk-Elektrophoresen bestätigt. Beide Methoden führen aber nur dann zum wirklichen Molekulargewicht des fraglichen Proteins, wenn dessen Molekülgeometrie und Dichte mit den Eichproteinen übereinstimmt (Andrews,1970; Maurer,1971). Falls hier eine deutliche Abweichung auftritt, könnte eine Überschätzung des Molekulargewichts resultieren und es dem durch SDS-Elektrophorese erhaltenen Wert von 42000 näher bringen. Bei der SDS-Elektrophorese kann von gleicher Molekülform aller Proteine ausgegangen werden (Maurer,1971; Reynolds & Tanford,1970), jedoch sollte sie nur mit nachweislich reinen Proteinen durchgeführt werden, da eine spezifische Aktivitätsanfärbung nicht möglich ist.

In einem der nach 3.4.1. durchgeführten Sephadex-G-100-Läufe wurde auch Malat-Dehydrogenase (MDH) aus Schweineherzmitochondrien mit aufgenommen und ein scheinbares Molekulargewicht von 61000 erhalten. MDH wurde also nicht übersondern unterbewertet, da für sie ein Molekulargewicht von 67-72000 gesichert ist (Murphey et al.,1967; Banaszak & Bradshaw,1975). Ein ähnliches Verhalten fand Hägele (1977) bei nativer c-MDH aus Hefe, die auf Sephadex G-100 mit vergleichbaren Eichproteinen ein Molekulargewicht von 61000 und in der Gleichgewichtssedimentation ein solches von ca. 75000 aufwies. Er führte dies auf die hydrodynamischen Eigenschaften des nativen Enzyms zurück. Bei der Sephadex-G-150-Chromatographie (Jung et al.,1975) wurden hauptsächlich Dehydrogenasen als Eichproteine verwendet, sodaß nach Andrews (1970) hier eher von zur 15HPGDH gleichartigen Molekülparametern ausgegangen werden kann. Bei dieser Chromatographie in Gegenwart von 10% Glycerin trat ein so erheblicher Aktivitätsverlust auf, daß vermutet werden könnte, es handele sich um eine kaum noch aktive Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 29-35000. Schlegel & Greep (1975) schlugen für 15HPGDH aus Humanplacenta einen Aufbau aus Untereinheiten vor.

Nach diesen Erörterungen erscheinen zwei Interpretationen der Ergebnisse am wahrscheinlichsten. Besteht 15HPGDH aus

Humanplacenta aus einer einzigen Polypeptidkette, wie von Braithwaite & Jarabak (1975) vorgeschlagen, so dürfte deren Molekulargewicht zwischen 40000 und 65000 liegen. Das Enzym könnte jedoch auch aus zwei Untereinheiten vom Molekulargewicht 29-35000 aufgebaut sein, wobei eine ausreichende Glycerinkonzentration das Gesamtmolekül vor der Dissoziation in die Untereinheiten bewahren sollte. Eine abschließende Klärung dieser Frage ist auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich und bedarf weiterer umfangreicher Untersuchungen.

5.4. OPTIMIERUNG DER TESTBEDINGUNGEN FÜR ENZYMKINETISCHE STUDIEN

Will man enzymkinetische Studien betreiben, muß zunächst das zu messende Produkt (oder Substrat) festgelegt werden. Im Fall der Hinreaktion NAD-abhängiger Dehydrogenasen ist das Produkt der Wahl NADH, falls, wie im vorliegenden Fall, störende enzymatische Fremdaktivitäten in den verwendeten Enzymfraktionen ausgeschlossen werden können. Schwieriger, aber nicht weniger wichtig, ist die Wahl günstiger Testbedingungen. Puffer können aktivieren oder hemmen, pH und Temperatur den Mechanismus der Enzymkatalyse oder den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der enzymatischen Reaktion verändern, und Inhibitoren in Substrat- oder Enzymlösungen die Ergebnisse beeinflussen (Dixon & Webb,1967; Fromm,1975). Unterschiedliche Testbedingungen dürften z.B. ein Hauptgrund für die stark differierenden Angaben zu kinetischen Konstanten der 15HPGDH-katalysierten Reaktion sein (Hansen,1976). Systematische Untersuchungen zur Wahl der Testbedingungen für 15HPGDH wurden bisher von einer anderen Gruppe nicht vorgelegt. Die hierzu gezeigten Ergebnisse werden im folgenden besonders unter diesem Aspekt diskutiert und dargelegt, warum 100mM TRAP, pH 7.4 und 37^{o}C als Testbedingungen gewählt wurden. Dabei war ein wichtiges Motiv physiologischen Bedingungen, soweit dies bei "in vitro" Messungen mit gereinigten Enzymen überhaupt möglich ist, nahe zu kommen, um eine höhere Relevanz der gesammelten Daten zu erreichen.

Wie wichtig die Wahl des "richtigen" Puffers ist, zeigen u.a. die Veröffentlichungen von Good & Izawa (1972) und Ellis & Goldberg (1972). Auch die Pufferkonzentration kann von erheblichem Einfluß auf enzymkinetische Parameter sein (Alberty et al.,1954; Alberty,1954). Der konzentrationsabhängige Einfluß verschiedener Puffer und Salze auf die Anfangsgeschwindigkeit der 15HPGDH-Reaktion bei pH 7.4 ist in Abb.9 dargestellt. Schreibt man den identischen Effekt von NaCl und KCl der Erhöhung der Ionenstärke zu, dann haben Na^+, K^+ und Cl^- keine spezielle Wirkung auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Demgegenüber erhöht NH_4^+ die 15HPGDH-Aktivität, während SO_4^{2-} insbesondere bei höheren Konzentrationen deutlich hemmt. Vergleichbare Effekte zeigen die entsprechenden untersuchten Puffer, deren pK-Werte bei 37°C in der Nähe von pH 7.4 liegen. Dabei fällt auf, daß TRAP, ein tertiäres Amin, einen dem NaCl und KCl sehr ähnlichen Einfluß ausübt. TRAP ist also am ehesten der für dieses System inerte Puffer. Eine TRAP-Konzentration von 100mM wurde gewählt, weil Puffer und Salze bei niedrigen Ionenstärken die geringsten Effekte auf die 15HPGDH-Aktivität zeigen, andererseits aber eine ausreichende Pufferkapazität des Systems erwünscht ist.

Der pH des Testsystems kann neben der Maximalgeschwindigkeit und den Michaeliskonstanten auch den Mechanismus oder den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt einer enzymatischen Reaktion beeinflussen (Cleland,1970; Schimerlick & Cleland,1973; Renard & Fersht,1973; vgl. 4.4.4.). Zur Messung der pH-Abhängigkeit der 15HPGDH-Hinreaktion bei annähernd sättigenden Substratkonzentrationen konnten 100mM TRAP über den gesamten pH-Bereich, d.h. auch außerhalb des eigentlichen Pufferbereichs von TRAP, eingesetzt werden, da der pH direkt im Ansatz oder einem Vergleichsansatz bei 37°C gemessen wurde. Dies erscheint in Anbetracht der unterschiedlichen Einflüsse verschiedener Puffer besonders wichtig (vgl. Alberty & Massey,1954). Die pH-Kurven (Abb. 10,11) zeigen unabhängig von der spezifischen Aktivität der eingesetzten Enzymfraktion (300 bzw. 4300mIU/mg Protein) und der Art des PG (E_2 bzw. $F_{2\alpha}$) einen prinzipiell

gleichen Verlauf. Hierbei dürfte also keine entscheidende Rolle spielen, daß die PGE unterhalb und die PGF oberhalb von pH 7 eine höhere chemische Stabilität aufweisen (Roseman et al.,1973).

Eine genaue Auswertung der pH-Abhängigkeit enzymkatalysierter Reaktionen hat meist zum Ziel, über die ermittelten pK-Werte Rückschlüsse auf funktionelle Gruppen im aktiven Zentrum des Enzyms zu ermöglichen (Dixon,1953a; Alberty & Massey,1954). Dazu sollten allerdings bei Bisubstratreaktionen, wie hier nicht geschehen, die extrapolierten Maximalgeschwindigkeiten und limitierenden Michaeliskonstanten bei verschiedenen pH-Werten ermittelt werden (Cleland, 1970). Weitere Schwierigkeiten bei der Interpretation bringen die ungenaue Kenntnis der pK-Werte von funktionellen Aminosäuregruppen in Proteinen und die Möglichkeiten, daß sich mit dem pH Mechanismus oder geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Reaktion, Dissoziationsgrad des Substrats und Konformation des Enzyms ändern können (Fromm,1975). Die folgende Diskussion ist unter diesen Einschränkungen zu sehen.

Vergleicht man verschiedene graphisch dargestellte pH-Abhängigkeiten der 15HPGDH aus Humanplacenta (Abb.10-12; Rückrich,1974; Schlegel et al.,1974), so ergibt sich folgendes Bild. Der Verlauf der Kurve hängt ab von der eingesetzten NAD und/oder PG-Konzentration, der Art und Konzentration des Puffers, der Vorinkubationszeit des Enzyms, der Temperatur und höchstens in sehr geringem Maß von der Art des PG. Aus dem Anstieg der verschiedenen Kurven zwischen pH 5 und 7 könnte man auf die Beteiligung einer Imidazolgruppe an der Enzymkatalyse schließen, die in Proteinen pK-Werte zwischen 5.6 und 7 aufweisen soll (Fromm, 1975). Jedoch geht aus Abb.11 hervor, daß in diesem Bereich mit einer Säuredenaturierung des Enzyms während der Vorinkubation zu rechnen ist. Die berichtigte Kurve läßt den Schluß zu, daß der Dissoziationsgrad des Substrates im Bereich unter pH 6.5 eine Rolle spielt. Die Carboxylgruppe von $PGF_{2\alpha}$ weist einen pK-Wert von 4.9 auf (Roseman

et al.,1973) und die Methylester von $PGF_{2\alpha}$ und PGE_1 erwiesen sich als wesentlich schwächere Substrate der 15HPGDH als die freien Carbonsäuren (Thaler-Dao et al.,1976; Sun et al.,1976). Das eigentliche Substrat sollte also das PG-Anion sein, das auch oberhalb von pH 7 fast ausschließlich vorliegt. Die freie Säure könnte eine geringe Aktivität aufweisen, inaktiv sein oder sogar hemmen. In diesem Zusammenhang erscheint auch der Verlauf der pH-Abhängigkeit der Rückreaktion interessant, die ein Optimum bei pH 5.6 und einen schnellen Aktivitätsabfall zu niedrigen pH-Werten hin aufweist (Baier,1977; Yamazaki & Sasaki,1975).

Zwischen pH 7.4 und 9.3 ist der Verlauf der pH-Kurve unter den Bedingungen von Abb.11 unabhängig von der Vorinkubationszeit des Enzyms, wenn diese 5min nicht übersteigt. Bei höheren pH-Werten führt eine Verkürzung der Vorinkubationszeit zu einer Erhöhung der Anfangsgeschwindigkeit. Außerdem haben die Schreiberkurven hier kürzere lineare Bereiche. Beide Effekte treten bei tieferer Temperatur erst bei höheren pH-Werten auf. Dies alles sind Hinweise darauf, daß der Aktivitätsabfall bei hohen pH-Werten auf eine Alkaliinaktivierung der 15HPGDH zurückzuführen ist.

Der ungewöhnliche Verlauf der pH-Kurven der Abb.10 und 11 fand durch keinen der untersuchten banalen Effekte eine Erklärung. Weder ändert NADH innerhalb dieses pH-Bereichs seinen Extinktionskoeffizienten wesentlich (Blume,1973) noch spielen Spontanreaktion, NAD-Reduktase-Aktivität oder das Absorptionsverhalten eines Substrats oder Produkts neben NADH im pH-Maximum eine Rolle. Der zweite Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit mit dem pH oberhalb pH 8 ist also auf einen Vorgang zurückzuführen, an dem das Enzym selbst maßgeblich beteiligt ist. Ein Maximum oberhalb pH 8 tritt allerdings nur auf, wenn während der Vorinkubation und Messung ausreichend hohe NAD-Konzentrationen vorhanden sind. Die NAD-Konzentration beeinflußt die Lage (und Höhe) des pH-Maximums: oberhalb pH 9.3 bei 1-2mM NAD (Abb.10-12; Rückrich,1974),ca. pH 9 bei 0.15-0.4mM NAD (Rückrich,1974; Matschinsky et al.,1974) und kein gesondertes Maximum bei 0.05mM NAD (Schlegel et al.,1974).

Der steile Anstieg der 15HPGDH-Aktivität oberhalb von pH 8 könnte auf einer schrittweisen Konformationsänderung des Enzymproteins beruhen, die letztendlich zur Alkaliinaktivierung führt. Ein Zwischenzustand mit erhöhter Maximalgeschwindigkeit wäre durch NAD stabilisierbar oder/und in seiner Affinität zu beiden Substraten erniedrigt (vgl. Abb. 13; 4.4.4.), sodaß ein gegenüber pH 7.4 stärkerer Einfluß der NAD-Konzentration auf die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit resultierte (vgl. Siliski & Colman,1974). Auf Veränderungen im aktiven Zentrum des Enzyms weist hin, daß durch 15HPGDH aus Rinderlunge bei pH 9.5 eine deutliche Umsetzung von PGB_2 festgestellt wurde, während PGB_2 bei niedrigen pH-Werten kein Substrat der 15HPGDH ist (Matschinsky et al.,1974). Eine Korrelation besteht zwischen dem Anstieg der Enzymaktivität oberhalb pH 8 und den pK-Werten von SH-Gruppen in Proteinen, die zwischen 8.3 und 8.6 liegen sollen (Fromm,1975). Die Dissoziation einer oder mehrerer SH-Gruppen könnte zur erhöhten Aktivität beitragen, entweder durch direkte Beteiligung des Anions an der Enzymkatalyse oder durch die Einleitung der oben erwähnten Konformationsänderung des Enzymproteins mit einer Auswirkung auf das aktive Zentrum.

Eine oder mehrere SH-Gruppen spielen eine entscheidende Rolle für die Erhaltung der 15HPGDH-Aktivität. Durch Luftsauerstoff, Ellmans Reagenz oder Phenylquecksilberacetat inaktivierte 15HPGDH aus Humanplacenta kann durch SH-Schutzreagenzien wie z.B. ME zumindest teilweise reaktiviert werden (Rückrich,1974; Thaler-Dao et al.,1974). Die Vorwegnahme des Effekts hoher pH-Werte durch 500mM TRIS/HCl bei pH 7.4 (Rückrich,1974; Jung et al.,1975) könnte ebenfalls auf einer entsprechenden Konformationsänderung, möglicherweise unter Beteiligung von SH-Gruppen, beruhen.

Diese Überlegungen sprechen dafür, kinetische Messungen nicht bei pH-Werten über 8 durchzuführen, wenn die erhaltenen Daten, unter den erwähnten Vorbehalten, Rückschlüsse auf die Vorgänge in der Zelle erlauben sollen. Unterhalb pH 7 sollte nicht gemessen werden, um eine vollständige

Dissoziation der Carboxylgruppe der PG zu gewährleisten. pH 7.4 wurde aber auch deshalb gewählt, weil er sich inmitten eines Plateaus der in 100mM TRAP ermittelten pH-Kurven befindet, sodaß Meßfehler durch geringe pH-Verschiebungen nicht auftreten sollten. Im engen pH-Maximum von je nach Meßbedingungen 9-10 wird der Meßfehler bei kleinen Veränderungen des pH und der Vorinkubationszeit und durch die kürzeren linearen Bereiche der Schreiberkurven relativ groß.

Aus Abb.15 erhält man nach 3.4.3. eine Aktivierungsenergie von 13.6 kcal/Mol für die Hinreaktion der 15HPGDH aus Humanplacenta, gemessen in 100mM TRAP bei pH 7.4 mit NAD und PGE_2 als Substraten. Dies entspricht im verwendeten Temperaturbereich einer molaren Aktivierungsenthalpie von ca. 13 kcal/Mol. Braithwaite & Jarabak (1975) fanden in 100mM TRIS/HCl bei pH 9 mit NAD und PGE_1 eine Aktivierungsenergie von 9.9 kcal/Mol. Die Differenz dieser Werte wird durch die unterschiedlichen Meßbedingungen hinreichend erklärt und ist ein weiterer Hinweis für deren Bedeutung.

Die Linearität der Temperaturabhängigkeit der 15HPGDH-Hinreaktion zwischen 20 und 37°C weist darauf hin, daß in diesem Bereich unter den verwendeten Bedingungen bei Temperaturänderungen nicht mit einer aktivitätsbeeinflussenden Konformationsänderung des Enzyms oder einer Änderung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Hinreaktion gerechnet werden muß (Dixon & Webb,1967; Siliski & Colman, 1974). Für einen geringen Einfluß der Temperatur auf das kinetische Verhalten der 15HPGDH, wenn im pH-Bereich zwischen 7 und 8 gemessen wird, spricht auch, daß die von Schlegel und Greep (1975) bei 25°C erhaltenen kinetischen Daten in Anbetracht der Fehlermöglichkeiten nicht signifikant verschieden sind von den entsprechenden unter 4.5. dargestellten Ergebnissen, die bei 37°C ermittelt wurden. 15HPGDH aus Humanplacenta ist unter Standardtestbedingungen im untersuchten Temperaturbereich während der Vorinkubationszeit und nach dem Start der Reaktion noch mindestens 10min stabil. Bezüglich dieser Ergebnisse stehen also alle

Temperaturen zwischen 20 und 37°C zur Wahl, wobei es sinnvoll ist, die Diskussion auf die für enzymatische Messungen gebräuchlichsten Temperaturen von 25, 30 und 37°C zu beschränken. Für den Bereich der klinischen Chemie, wo eine Standardisierung der Temperatur wichtiger als in der Forschung ist, wurde von Bergmeyer (1973) eine einheitliche Temperatur von 25°C empfohlen. Die von ihm theoretisch belegte geringe Meßgenauigkeit bei höheren Temperaturen konnte im vorliegenden Fall praktisch nicht bestätigt werden (Abb.15). Hier spielen offensichtlich andere Fehlermöglichkeiten eine größere Rolle. Ein wichtiger Faktor für die erfolgte Wahl von 37°C für kinetische Messungen war die Möglichkeit mit der gleichen, aufwendig isolierten Enzymmenge wesentlich mehr Messungen als bei 25°C durchführen zu können, wobei gleichzeitig weniger Glycerin in den Testansatz gelangte. Auch die höhere Löslichkeit oder "fluidity" (Lee,1977) einiger Modulatoren der 15HPGDH-Aktivität spricht für 37°C, zumal diese Temperatur physiologischen Bedingungen sicher nicht weniger entspricht als 25°C.

5.5. SUBSTRAT- UND ENZYMLÖSUNGEN FÜR KINETIKEN

Äthanol wird als Lösungsmittel für PG empfohlen, weil äthanolische PG-Lösungen stabiler sind als wäßrige (Roseman et al.,1973). Die nach der Definition von Cleland (1970) gegenüber PG linear nichtkompetitive Äthanolhemmung ist in ihrem Ausmaß stark von der eingesetzten PG-Konzentration abhängig. Bei geringen PG-Konzentrationen dürfte 1% Äthanol i.T. eine mehr als 20%ige Hemmung hervorrufen. Für die unter 4.5. und 4.6. dargestellten kinetischen Untersuchungen wurde Äthanol nicht eingesetzt, mit Ausnahme der PGD_2 (1%)-, TXB_2(0.5%)- und $15KPGE_1$(0.2%)-Lösungen, bei denen dies aus technischen Gründen günstiger war. Durch die unter 3.5.2. beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen waren auch die wäßrigen PG-Lösungen für die Dauer mindestens einer Meßreihe stabil. Eine dünnschichtchromatographische Reinheitskontrolle der PG wurde routinemäßig durchgeführt (3.3.1.).

Einige der für kinetische Untersuchungen verwendeten NAD-,

NADP- und NADH-Chargen wurden von Baier (1977, z.T. unveröffentlicht) dünnschichtchromatographisch auf ihre Reinheit überprüft. Für diese Nucleotide liegen Analysenzertifikate der Hersteller vor. Mit 15HPGDH aus Humanplacenta wurden für die eingesetzten NAD- und NADH-Chargen beider Herstellerfirmen (vgl.3.3.2.) im Rahmen der Meßgenauigkeit gleiche kinetische Konstanten ermittelt.

Enzymatische Fremdaktivitäten waren in keiner der untersuchten hochangereicherten Enzymfraktionen mit den unter 3.3.4. beschriebenen optischen Tests nachweisbar. Nach 4. 3.4. kann davon ausgegangen werden, daß sowohl in A-50-Pool I und II als auch im Phenyl-Seph.-Pool (Tab.4) folgende Fremdaktivitäten, zumindestens unter den Bedingungen der kinetischen Untersuchungen, nicht auftreten: Alkohol-, Lactat- und 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, die besonders schwer von 15HPGDH abzutrennen sein soll (Thaler-Dao et al.,1974); NAD-Reduktase und NADH-Oxidase; NADP-abhängige 15HPGDH und NADH-abhängige PGE-9-Keto-Reduktase. Letztere wurde auch von Baier (1977) für A-50-Pool II mit der sehr empfindlichen Methode der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der enzymatischen Reaktionsprodukte von NADH und tritiummarkiertem PGE ausgeschlossen. In gleicher Weise, aber mit NADH und ^{3}H-15KPGE, gelang es ihm auch die Abwesenheit von NADH-abhängiger 15KPG-$\Delta^{13,14}$-Reduktase in dieser Enzymfraktion nachzuweisen. Dies bestätigt die hier vorgelegten entsprechenden Ergebnisse mit A-50-Pool I und nicht markiertem 15KPGE$_1$ (4.3.2.), die auf der weniger empfindlichen Methode beruhen, PG- und PG-Metabolite auf Dünnschichtchromatogrammen - nach Vorbehandlung mit NH_3 - mit Phosphormolybdänsäure anzufärben (3.3.1.). In den drei erwähnten Enzymfraktionen waren also keine die kinetischen Untersuchungen der Hin- und Rückreaktion der NAD-abhängigen 15HPGDH störenden enzymatischen Fremdaktivitäten aufzufinden. Der A-50-Pool D (Tab.4) wurde nur auf Alkohol-Dehydrogenase, NAD-Reduktase und NADH-Oxidase untersucht und alle drei Aktivitäten nicht gefunden.

Aus Tab.4 geht hervor, daß die Werte der scheinbaren

Michaeliskonstanten für NAD (0.1mM PGE_2, 100mM TRAP, pH 7.4) von rohen Enzymfraktionen mit spezifischen Aktivitäten ab 9mIU/mg Protein bis zum höchstangereicherten Phenyl-Seph.-Pool mit 43000mIU/mg Protein im Rahmen ihrer Bestimmungsgenauigkeit liegen. Auch die mit verschiedenen Enzympräparationen erhaltenen kinetischen Konstanten der Tab.11 und 17 sprechen dafür, daß 15HPGDH aus Humanplacenta im Lauf der hier und von Jung et al. (1975) beschriebenen Isolierungen ihr kinetisches Verhalten nicht entscheidend änderte. Die übereinstimmenden pH-Kurven der Abb.10 und 11 sowie die gleichartigen Effekte bei hohen PG-Konzentrationen (Abb.30,31) stützen diese These. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, daß verschieden reine 15HPGDH-Fraktionen bei der Gelfiltration über Sephadex G-100 gleiche scheinbare Molekulargewichte aufwiesen. Die einzige signifikante Abweichung von mit anderen hier beschriebenen Enzympräparationen erhaltenen Diagrammen oder Werten zeigt die mit A-50-Pool D ermittelte limitierende Michaeliskonstante für $PGF_{2\alpha}$ (Tab.11). Diese entspricht den von anderen Gruppen ebenfalls mit nicht sehr hoch angereicherten 15HPGDH-Präparationen erhaltenen scheinbaren Michaeliskonstanten für $PGF_{2\alpha}$ (Hansen,1976) eher als die drei übereinstimmenden mit A-50-Pool I und Phenyl-Seph.-Pool bestimmten Werte (Tab.11). Eine schlüssige Erklärung hierfür kann nicht gegeben werden, besonders unter Berücksichtigung der guten Übereinstimmung der entsprechenden K_m^{NAD} und der mit PGE_2 erhaltenen Konstanten (Tab.11).

Auch im Lauf einer Meßreihe sollte 15HPGDH aus Humanplacenta in Gegenwart von Glycerin aufbewahrt werden, um eine Inaktivierung des Enzyms zu vermeiden. Das dadurch notgedrungen in den Testansatz gelangende Glycerin hemmt augenscheinlich linear unkompetitiv gegenüber PG (4.4.6.). Die Stärke der Hemmung ist nur in geringem Maß abhängig von der eingesetzten PG-Konzentration. Ein Vergleich der in Gegenwart von 1% und 2.5% Glycerin i.T. erhaltenen kinetischen Parameter zeigt, daß innerhalb dieses Konzentrationsbereichs ein eventueller Einfluß von Glycerin im Rahmen

ihrer Bestimmungsgenauigkeit bleibt (Legende zu Abb.19-28; Tab.11). Marrazzi & Matschinsky (1972) fanden für 15HPGDH aus Schweinelunge keine Beeinflussung der scheinbaren Michaeliskonstanten für NAD durch Glycerin.

5.6. REAKTIONSMECHANISMUS EINER NAD-ABHÄNGIGEN 15-HYDROXY-PROSTAGLANDIN-DEHYDROGENASE

Das zur Auswertung der NAD/PG- und S-NAD/PGE_2-Kreuzserien verwendete Computerprogramm und die Berechtigung zu seiner Verwendung sind unter 3.5.3. dargestellt. Bei der Diskussion des unter diesen Bedingungen vorliegenden Mechanismus des untersuchten Enzyms wird analog zu Cleland (1970) unter Vernachlässigung des in der Reaktionsgleichung auftretenden Protons von einer Bisubstratreaktion in beiden Richtungen ausgegangen. Es wird das bewährte Prinzip des Ausschlusses plausibler Mechanismen verwendet, weil der direkte Nachweis des Mechanismus einer enzymatischen Reaktion nicht möglich ist.

Da die vom Computer ausgedruckten doppelt reziproken Primärdiagramme mit NAD und verschiedenen PG als variablen bzw. "fixierten" variablen Substraten im Bereich der verwendeten Substratkonzentrationen im Rahmen des Meßfehlers linear sind (Abb.19-28), zeigt 15HPGDH aus Humanplacenta hier kinetisch ein normales Michaelis-Menten-Verhalten. Die Konvergenz der Primärdiagramme schließt Ping Pong Mechanismen definitiv aus. Sie ist vielmehr das diagnostische Kriterium für einen sequentiellen Mechanismus nach der Definition von Cleland (1970).

Thaler-Dao et al. (1976) schlugen einen Random Mechanismus für 15HPGDH aus Humanplacenta vor. Im verwendeten Konzentrationsbereich der Substrate und Produkte (Abb.19-28) scheiden von den plausiblen sequentiellen Mechanismen Random Bi Bi, Rapid-Equilibrium Random Bi Bi und Rapid-Equilibrium Random Bi Bi mit E·NADH·PG- oder/und E·NAD·15KPG-"dead-end"-Komplex(en) auf Grund des in Tab.16 zusammengefaßten Produktinhibitionsmusters aus (Cleland,1963a; Reynard et al.,1961). Ein Rapid-Eqilibrium Random Bi Bi Mecha-

nismus mit vier "dead-end"-Komplexen, neben den beiden oben erwähnten noch E·NAD·PG·15KPG und E·NADH·15KPG·PG, ist mit dem Produktinhibitionsmuster der 15HPGDH zwar zu vereinbaren, aber nur sehr schwer vorstellbar (Wratten & Cleland,1963).

Braithwaite & Jarabak (1974a) schlugen, ohne Angabe von Meßbedingungen, zunächst einen Theorell-Chance-Mechanismus für die von 15HPGDH aus Humanplacenta katalysierte Reaktion vor. Offensichtlich wurden die entsprechenden Messungen bei pH 9 vorgenommen (Jarabak & Braithwaite,1976). Ein solcher Mechanismus ist mit den bei pH 7.4 in 100mM TRAP erhaltenen nichtkompetitiven Hemmungen von 15KPGE$_1$, 15KPGE$_2$ bzw. 15KPGF$_{2\alpha}$ gegenüber den entsprechenden PG (Abb.48-50) nicht in Einklang zu bringen. Außerdem spricht gegen diesen Mechanismus, daß die Anfangsgeschwindigkeitsmuster der Hin- und Rückreaktion Schnittpunkte im zweiten Quadranten aufweisen (Abb.19-28; Abb.56; Baier,1977). Liegt bei einem Theorell-Chance Mechanismus der Schnittpunkt im Primärdiagramm der Hinreaktion über der Abszisse, so muß derjenige im Primärdiagramm der Rückreaktion unter der Abszisse liegen (Fromm,1975). Gleiche Überlegungen gelten für einen Di-Iso Theorell-Chance Mechanismus nach der Definition von Fromm (1975), der für Lactat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel diskutiert wurde (Zewe & Fromm,1965). Ein Iso Ordered Bi Bi Mechanismus (Cleland,1963a; Mono-Iso Ordered Bi Bi Mechanismus nach Fromm,1975) ist mit der kompetitiven Produkthemmung von NADH gegenüber NAD (Abb.45,46) nicht zu vereinbaren.

Zu den Produktinhibitionsmustern der 15HPGDH passen also von den plausiblen sequentiellen Reaktionsmechanismen nur Ordered Bi Bi und Iso Theorell-Chance (Abb.58). 1970 schrieb Cleland über Mechanismen mit der Isomerisierung einer stabilen Enzymform wie sie im Iso Theorell-Chance vorkommt "...clear-cut examples of such mechanisms are not yet known..." und bis heute wurde offensichtlich für kein anderes Enzym ein Iso Theorell-Chance Mechanismus beschrieben (Fromm,1977). Hansen (1976) schlug diesen Mechanismus

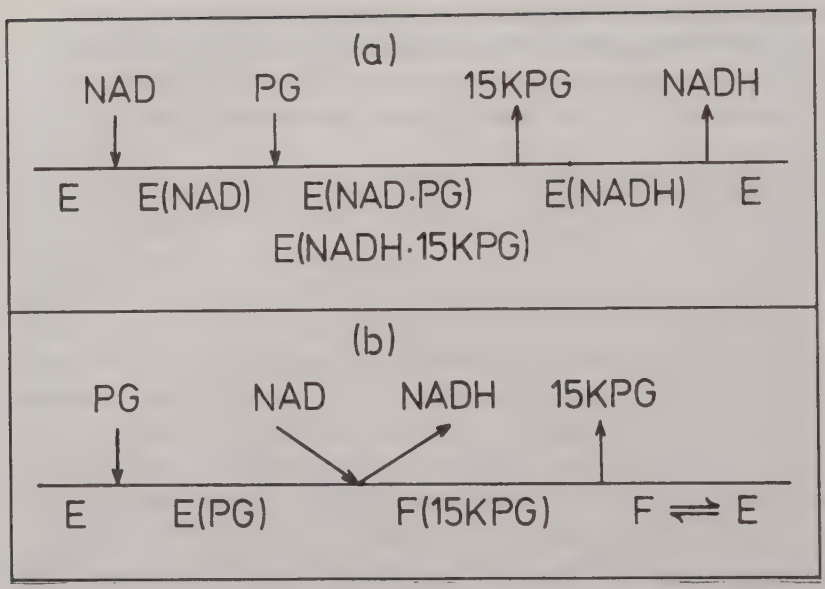

Abb.58 Mit dem Produktinhibitionsmuster der 15HPGDH-Hinreaktion vereinbare sequentielle Reaktionsmechanismen.
(a) Ordered Bi Bi mit NAD als führendem Substrat
(b) Iso Theorell-Chance mit PG als führendem Substrat

für 15HPGDH vor und zog zur Begründung neben von uns veröffentlichten Daten zwei Publikationen über Affinitätschromatographie mit NAD-abhängiger 15HPGDH aus Rinderlunge und Schweineniere heran (Rückrich et al.,1975; Nagasawa et al., 1974; Oliw et al.,1976). Mit einiger Berechtigung geht er dabei von einer geringen Organ- und Speziesspezifität des Enzyms aus.

In beiden erwähnten Publikationen gelang eine Bindung der 15HPGDH an PG-Sepharosen und nicht an NAD-Sepharose. Deswegen bevorzugt Hansen (1976) einen Iso Theorell-Chance Mechanismus, bei dem im Gegensatz zum Ordered Bi Bi PG das führende Substrat ist. Diese Argumentation ist nicht stichhaltig. Die an sich schon geringe "in-vitro"-Affinität von NAD zum Enzym - K_s^{NAD} beträgt ca. 0.13mM (Tab.11) - kann durch die Immobilisierung vermindert oder aufgehoben werden, insbesondere wenn zur Bindung an den Träger Gruppen

des NAD verwendet werden, die wichtig für die Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum des Enzyms sind (Bende,1974). Ferner können Pufferzusammensetzung (Enzymkonformation) und Enzymkonzentration über den Erfolg einer Affinitätschromatographie mit entscheiden. Das Ausbleiben der Bindung von 15HPGDH an die in der vorliegenden Arbeit, von Nagasawa et al. (1974) und Oliw et al. (1976) erprobten NAD-Sepharosen (Agarosen) kann daher nicht als Beweis für die Abwesenheit eines kinetisch signifikanten E·NAD-Komplexes herangezogen werden. Außerdem wurde bereits eine Bindung des Enzyms an NAD-Hexan-Agarose mit anschließender biospezifischer Elution durch NADH beschrieben, leider ohne genaue Angabe über die Art der Bindung des NAD an den Träger (Braithwaite & Jarabak,1975).

Die beschriebene Bindung der 15HPGDH an PG-Sepharosen kann nicht als Beweis für einen kinetisch signifikanten E·PG-Komplex gelten. Zur Elution des Enzyms wurde keine biospezifische Methode sondern die Senkung des pH auf 4 herangezogen. Im einen Fall wird das Ausbleiben einer Elution mit PGE_2 und im anderen das Ausbleiben einer Reaktion zwischen immobilisiertem PG und NAD in Gegenwart von 15HPGDH beschrieben (Oliw et al.,1976; Nagasawa et al.,1974). In beiden Fällen erfolgte die Immobilisierung über die Carboxylgruppe der PG. Besonders im Hinblick auf die Fähigkeit der 15HPGDH zu ausgeprägten hydrophoben Wechselwirkungen (s.o.) muß das Vorliegen "reiner" Affinitätschromatographien in Zweifel gezogen werden (Shaltiel,1974; O'Carra,1974). Nach O'Carra trägt eine Ligandenkonzentration über 2µMol/ml Träger, die in beiden Fällen vorliegt, erheblich zur Gefahr unspezifischer Wechselwirkungen bei. Auch das Ausbleiben einer Bindung an u.a. PGB_2-Sepharose (Oliw et al.,1976) spricht nicht für eine "reine" biospezifische Chromatographie. Die PGB sind zwar bei pH 7.4 keine Substrate der 15HPGDH, jedoch ist PGB_1 ein Inhibitor mit höherer Affinität zum Enzym als das Substrat $PGF_{2\alpha}$ (4.5.1., 4.5.3.). In diesem Sinn führen Thaler-Dao et al. (1974) als mögliche Erklärung für die Bindung der 15HPGDH an Östron-Sepharose

hydrophobe Wechselwirkungen an. Selbst für den Fall einer zweifelsfreien Affinitätschromatographie an PG-Sepharose ist ein Mechanismus mit NAD als führendem Substrat nicht ausgeschlossen: die Bildung eines E·PG-Komplexes, der bei niedrigen PG-Konzentrationen kinetisch nicht relevant ist, könnte bei sehr hohen PG-Konzentrationen und/oder in Abwesenheit von NAD signifikant werden (Wratten & Cleland, 1963; s.u.).

Nach der Entkräftung der für einen Iso Theorell-Chance Mechanismus der 15HPGDH herangezogenen Argumente bleiben als prinzipielle Wege zu seiner Eliminierung der Nachweis eines kinetisch signifikanten zentralen ternären Komplexes durch die Methode von Wratten & Cleland (1965) bzw. Isotopenaustauschstudien (Cleland,1970) oder der hier gewählte Weg des Nachweises, daß NAD das führende Substrat ist. Hierzu eignen sich in einigen Fällen "ordered" sequentieller Mechanismen Steady-State Untersuchungen mit einem alternativen Substrat. Mißt man in Gegenwart einer NAD-abhängigen Dehydrogenase und des alternativen Substrats S-NAD den Umsatz zwischen NAD und dem anderen Substrat beim isosbestischen Punkt von S-NAD/S-NADH, so wirkt sich die Konkurrenz der beiden Nucleotide als kompetitive Hemmung von S-NAD gegenüber NAD aus. Die Hemmung ist nichtkompetitiv gegenüber dem anderen Substrat, wenn dieses führend ist. Für den Fall, daß zunächst NAD an das freie Enzym bindet, erhält man eine im Diagramm 1/v gegen die reziproke Konzentration des anderen Substrats nichtlineare Hemmung (Rudolph & Fromm,1970), falls die Relationen der kinetischen Konstanten für NAD und S-NAD eine Abweichung von der Linearität erlauben (Fromm,1977). Die Vereinfachung der von Rudolph & Fromm (1970) angegebenen Gleichung für diese Hemmung führt zur Form einer 2/1-Funktion nach der Definition von Cleland (1963b; vgl. 3.5.3.), die eine Krümmung nahe der Ordinate und eine Assymptote bei hohen Abszissenwerten aufweist. Die in Abb.44 gezeigte nichtlineare Hemmung schließt für 15HPGDH einen sequentiellen Mechanismus mit PG als führendem Substrat, d.h. einen Iso Theorell-

Chance, definitiv aus (Fromm,1977). Der, soweit aus den Meßpunkten ersichtlich, einer 2/1-Funktion entsprechende Verlauf der Hemmkurve weist vielmehr einen kinetisch signifikanten E·NAD-Komplex nach. Ein entsprechendes Ergebnis wurde auch in ca. 100mM TRIS/HCl bei pH 9 erhalten (Jarabak & Braithwaite,1976).

Auch die PGB_1-Hemmung spricht für eine Bindung von NAD an das freie Enzym. In 100mM TRAP bei pH 7.4 hemmt PGB_1 linear kompetitiv gegenüber PGE_2 und linear unkompetitiv gegenüber NAD. (Abb.34-36). Dies ist typisch für einen gegenüber dem zweiten Substrat kompetitiven "dead-end"-Inhibitor in einem Ordered Bi Bi Mechanismus mit NAD als führendem Substrat. Die für 15HPGDH aus Schweinelunge und Humanplacenta veröffentlichte, leider nicht durch Abbildungen belegte, nichtkompetitive Hemmung von PGB_1 gegenüber PGE_1 könnte auf den anderen pH und/oder Puffer in den Testansätzen zurückzuführen sein (Nakano et al.,1969; Jarabak & Braithwaite,1976). Die Hemmung durch die $PGF_{2\alpha}$-Analogen ICI 86,384 und ICI 87,907 kann zu dieser Diskussion nicht herangezogen werden, da sie offensichtlich keine einfachen "dead-end"-Inhibitoren sind (s.u.).

Eine notwendige Voraussetzung für einen Ordered Bi Bi Mechanismus ist die Unabhängigkeit der Dissoziationskonstanten des führenden Substrats von der Art des verwendeten zweiten Substrats (Wratten & Cleland,1965). Tatsächlich sind die in Tab.11 aufgeführten K_s^{NAD} nicht signifikant verschieden, wenn man ihre Bestimmungsgenauigkeit einkalkuliert. Dasselbe gilt für die K_s^{NADH} der Rückreaktion (Baier, 1977; 4.6.2.), die erwartungsgemäß mit den durch Produktinhibitionsstudien der Hinreaktion in Gegenwart verschiedener PG erhaltenen K_i^{NADH} übereinstimmen (Tab.17).

Demgegenüber können die mit den Endoperoxidanalogen und PGA_1 ermittelten K_m^{NAD} als verschieden von den mit PGE_1, E_2 und $F_{2\alpha}$ erhaltenen Werten angesehen werden (Tab.11). Auch die K_m^{NADH} für $15KPGE_2$ bzw. $15KPGF_{2\alpha}$ scheinen sich zu unterscheiden (Baier,1977). Dies widerspricht aber einem Ordered Bi Bi Mechanismus nicht, da hier der K_m^{NAD} in Geschwin-

digkeitskonstanten ausgedrückt dem Quotienten $k_5k_7/k_1(k_5 + k_7)$ entspricht (Fromm,1975). k_5 steht für die Dissoziation von 15KPG vom entsprechenden ternären Komplex und beinhaltet den Einfluß des PG auf K_m^{NAD}. Analoge Überlegungen gelten für K_m^{NADH}. Leider läßt sich an Hand der vorliegenden Daten nicht klarstellen, ob die K_s^{PGE2} für NAD und S-NAD mit $(11 \pm 1)\mu M$ bzw. $(28 \pm 8)\mu M$ signifikant verschieden sind, da die Standardabweichung des zweiten Wertes durch die geringe Anzahl von fünfzehn Meßpunkten sehr hoch ist.

Auch die bei Messung der NADH-Bildung nichtkompetitive Hemmung des alternativen Produkts $15K13,14DPGF_{2\alpha}$ gegenüber PG (Abb.55) fügt sich zwanglos in einen Ordered Bi Bi Mechanismus mit der Bindung von NAD und NADH an das freie Enzym (Wratten & Cleland,1965). Für diesen Mechanismus ist zu fordern, daß alle Produkthemmungen linear sind (Cleland, 1963b). Das trifft für die NADH-Hemmungen bis mindestens 0.05mM (ca. $5xK_i^{NADH}$, ca. $40xK_m^{NADH}$), für die $15KPGE_1$- und $15KPGF_{2\alpha}$-Hemmungen im gemessenen Konzentrationsbereich und für die $15KPGE_2$-Hemmungen bis mindestens 0.35mM (ca. $2 x K_i^{15KPGE2}$, ca. $10xK_m^{15KPGE2}$), wahrscheinlich aber sogar bis 1mM zu (Abb.45-50,53,54). Die bei hohen Produktinhibitorkonzentrationen auftretenden Abweichungen von der Linearität werden zusammen mit der Substrathemmung der Rückreaktion durch NADH und den Effekten hoher PG-Konzentrationen diskutiert (s.u.).

Erläutert werden muß auch, warum die nichtkompetitive Produkthemmung von $15KPGE_2$ gegenüber NAD selbst bei einer fixierten PGE_2-Konzentration von 0.3mM, die mehr als 100-fach über K_m^{PGE2} liegt, nicht unkompetitiv wird (Abb.52b) wie im angesprochenen Mechanismus bei sättigenden PGE_2-Konzentrationen zu erwarten wäre (Cleland,1963a). Nach der unter 3.5.3. angegebenen Formel für den reziproken Abszissenabschnitt des Schnittpunkts im Primärdiagramm der $15KPGE_2$/NAD-Hemmung müßte dessen Betrag nämlich mit der Erhöhung der fixierten PGE_2-Konzentration kleiner werden bis bei sättigender PGE_2-Konzentration eine unkompetitive Hemmung resultierte. In der graphischen Darstellung der unter

3.5.3. angeführten Geradengleichung entspricht dies einer durch den Ursprung gehenden Extrapolation der Werte. Die in Gegenwart von 0.01 und 0.05mM PGE_2 erhaltenen reziproken Schnittpunktsabschnitte liegen auf einer solchen Ursprungsgeraden, während der für 0.3mM PGE_2 erhaltene Wert von dieser abweicht. Dieses untypische Verhalten beruht höchstwahrscheinlich auf dem gleichen Grund wie das bei dieser PGE_2-Konzentration zu beobachtende Phänomen einer "Substrataktivierung". Jarabak & Braithwaite (1976) fanden bei pH 7 bereits in Gegenwart von 0.067mM PGE_2, entsprechend $25xK_m^{PGE2}$, eine unkompetitive Hemmung von $15KPGE_2$ gegenüber NAD. Dies ist insofern erstaunlich, als Cleland (1970) auf Grund seiner theoretischen Ableitungen dafür erst eine Konzentration des zweiten Substrats von mindestens $100xK_m$ für ausreichend hält.

Unter den beschriebenen Bedingungen (Abb.29-31) ist für PGE_1 eine Substrathemmung oberhalb $20xK_m^{PGE1}$ zu beobachten, während für $PGF_{2\alpha}$ bzw. PGE_2 eine "Substrataktivierung" oberhalb 20x bzw. $100xK_m$ signifikant wird. Das Lineweaver-Burk-Diagramm der Rückreaktion für $15KPGE_2$ in Gegenwart einer festen Konzentration von 0.05mM NAD ist unter diesen Bedingungen bis $10xK_m^{15KPGE2}$ linear und zeigt eine deutliche Substrathemmung erst bei 1mM $15KPGE_2$ (Baier,1977). Demgegenüber fanden Jarabak & Braithwaite (1976) sowohl in 100mM KP bei pH 7 als auch in 100mM TRIS/HCl bei pH 9 mit PGE_1, PGE_2, $15KPGE_1$ und $15KPGE_2$ eine Substrathemmung, die schon ab 0.067mM auftrat. Sie erklären diesen Effekt mit der Bildung von E·PG-, E·15KPG-, E·NAD·15KPG- und E·NADH·PG-"dead-end"-Komplexen bei hohen PG- bzw. 15KPG-Konzentrationen. "Dead-end"-Komplexe reichen aber nicht aus zur Erläuterung der hier in 100mM TRAP bei pH 7.4 erhaltenen "Substrataktivierung" durch PGE_2 und $F_{2\alpha}$, die bei allen untersuchten NAD-Konzentrationen auftrat (0.05-2mM) und auch mit der höchstangereicherten Enzymfraktion ermittelt wurde. Mit Leber-Alkohol-Dehydrogenase wurde übrigens bei hohen Alkohol- bzw. Aldehydkonzentrationen, je nach Art des eingesetzten Substrats, Substrathemmung, Substrataktivierung oder auch kein Effekt erzielt (Wratten & Cleland,1965).

Bei 15HPGDH kommen für die beschriebenen Effekte hoher Substratkonzentrationen verschiedene Ursachen in Frage. Eine scheinbare Aktivierung durch eine nicht identifizierte Dehydrogenase mit wesentlich höherem K_m für PG bzw. 15KPG in der Enzympräparation erscheint wegen der hohen spezifischen Aktivität des Phenyl-Seph.-Pools sehr unwahrscheinlich, ist aber nicht ausgeschlossen (s.o.). Die Hemmungen könnten auf einer dünnschichtchromatographisch nicht nachgewiesenen Verunreinigung in den PG- und 15KPG-Chargen beruhen. Ein dem Triton X-100 ähnlicher Detergenzieneffekt - PG sind höhere Fettsäuren - ist unwahrscheinlich, da beide Effekte additiv sind (vgl. Abb.18b). Außerdem tritt die PGE_2-"Aktivierung", im Gegensatz zur Triton-"Aktivierung", auch bei einer NAD-Konzentration im Bereich des K_m^{NAD} auf.

Für 15HPGDH aus Schweineniere wurde auf Grund von Modifikatoreffekten eine weitere, von den Substratstellen verschiedene, Bindungsstelle postuliert (Tai & Hollander, 1976a,b). Eine oder mehrere Bindungsstellen außerhalb des aktiven Zentrums mit geringer Affinität zum PG sind ebensowenig ausgeschlossen wie Enzymassoziation bzw. -Dissoziation bei hohen Substratkonzentrationen, die alle zur Erklärung der beschriebenen Effekte herangezogen werden können. Außerdem könnte es sich bei 15HPGDH um ein Enzym mit "half-site reactivity" handeln (Lazdunski,1972; Bernhard & MacQuarrie,1973; Chappelet-Tordo et al.,1974; Schwendimann et al.,1976). Diese Möglichkeit wurde in der Literatur bisher allerdings nur im Zusammenhang mit dem Aufbau des entsprechenden Enzyms aus einer geraden Anzahl von Untereinheiten, der für 15HPGDH bisher noch nicht nachgewiesen ist (s.o.), diskutiert.

Zur Erläuterung des kinetischen Verhaltens der 15HPGDH aus Humanplacenta bei hohen PG- bzw. 15KPG-Konzentrationen, wozu auch die Effekte bei den $15KPGE_2$-Produkthemmungen zählen, kann auch ein alternativer Weg zum Ordered Bi Bi Mechanismus in Erwägung gezogen werden. Dieser sollte E·PG- und E·15KPG-Komplexe mit sehr hohen Dissoziationskonstanten einschließen, die keine oder nur bei bestimmten PG bzw.

15KPG "dead-end"-Komplexe sind, zumindest im Fall von PGE_2 und $F_{2\alpha}$ also mit NAD bzw. NADH reagieren können. Anders ausgedrückt, handelte es sich dabei um einen geringen Randomanteil, der bei PG-Konzentrationen $< 20 \times K_m^{PG}$ kinetisch nicht relevant wäre, mit zunehmender PG-Konzentration aber immer mehr Gewicht erhielte. Eine solche Möglichkeit wurde von Dalziel (1957) für einen Theorell-Chance und von Wratten & Cleland (1963,1965) für einen Ordered Bi Bi Mechanismus diskutiert. Doppelt reziproke Primärdiagramme im Rahmen eines Random Bi Bi Mechanismus sind 2/1-Funktionen, die in der Nähe der Ordinate gekrümmt sind und bei niedrigen Substratkonzentrationen assymptotisch linear werden, beim Vorliegen bestimmter Relationen einiger Geschwindigkeitskonstanten sogar über einen relativ großen Konzentrationsbereich (Wratten & Cleland,1965; Pettersson,1972). Pettersson bezeichnet Rapid-Equilibrium Random Bi Bi und Ordered Bi Bi als Extremfälle eines "random-ordered ternary-complex mechanism". Nach Wratten & Cleland (1963) sollte jedoch ein Mechanismus dann als "ordered" bezeichnet werden, wenn - wie hier für PG-Konzentrationen $< 20 \times K_m^{PG}$ - ein Weg den Hauptreaktionsfluß trägt und der alternative Weg so wenig ausgeprägt ist, daß er durch kinetische Studien nicht nachgewiesen werden kann. Nur eine umfangreiche Analyse der Effekte hoher PG-Konzentrationen, die den Rahmen dieser Dissertation sprengen würde, kann zur vollständigen Aufklärung ihrer Ursache(n) führen.

Eine genauere Aussage erlauben die unter den Bedingungen der Hinreaktionsmessungen erhaltenen Daten zur Substrathemmung der Rückreaktion durch NADH, wenn man die Möglichkeit ausschließt, daß diese auf einer Verunreinigung in den NADH-Chargen beruht[1)]. Während nämlich das Lineweaver-

---

[1)] Es wurde die unseres Wissens reinste käufliche NADH-Charge verwendet (vgl. auch 5.5.). Ihre Verunreinigung durch einen gegenüber NADH kompetitiven Inhibitor würde keine Substrathemmung vortäuschen, während ein Inhibitor, der an E, E·NADH und E·NADH·15KPG bindet, zu einem hyperbolischen Verlauf beider Diagramme in Abb.57 führen würde (Fromm,1977).

Burk-Diagramm für NAD bis mindestens 5mM linear ist (Abb. 41), erhält man bei einer fixen 15KPGE$_2$-Konzentration von 0.1mM 15KPGE$_2$ oberhalb von 0.05mM NADH eine hyperbolische Substrathemmung mit der Ordinate als Assymptote (Baier, 1977). Das aus dem linearen Primärdiagramm 1/v gegen 1/[15KPGE$_2$] erhaltene Sekundärdiagramm Ordinatenabschnitte gegen 1/[NADH] ist bis mindestens 0.2mM NADH linear (Abb. 57a). Demgegenüber zeigt das Sekundärdiagramm Steigungen gegen 1/[NADH] zur Ordinate hin eine aufwärts konkave Abweichung von der Linearität, die ein Minimum bei ca. 0.055 mM NADH aufweist (Abb.57b). Diese Ergebnisse entsprechen einer kompetitiven Substrathemmung von NADH gegenüber 15KPG unter Bildung eines "dead-end"-E·(NADH)$_2$-Komplexes (Segel, 1975). Die Dissoziationskonstante des ternären Komplexes liegt dabei mehr als eine Zehnerpotenz über der des E·NADH-Komplexes. Die Bindung des zweiten NADH könnte zusätzlich zum ersten im aktiven Zentrum des Enzyms oder an einer zweiten Bindungsstelle erfolgen.

In der Definition eines Ordered Bi Bi Mechanismus von Cleland (1970) sind als Möglichkeiten Isomerisierungen des zentralen ternären Komplexes und der beiden binären Komplexe enthalten. Eine Aussage über die genaue Zahl der ternären Komplexe ist mit Hilfe der vorliegenden Daten nicht möglich. Nach Cleland (1963a) sollten Isomerisierungen der binären Komplexe E·NAD bzw. E·NADH dann in Betracht gezogen werden, wenn Geschwindigkeitskonstanten monomolekularer Reaktionsschritte in der Reaktionsrichtung kleiner sind als die zugehörige Wechselzahl V/E_t. In Kapitel 4.6.3. sind die für einen Ordered Bi Bi Mechanismus der 15HPGDH-Reaktion errechneten Geschwindigkeitskonstanten aufgeführt. Für die Hinreaktion gilt $k_5 = 1.2V_1/E_t$ (E_2) bzw. $2.5V_1/E_t$ ($F_{2\alpha}$) und $k_7 = 7.1V_1/E_t$ (E_2) bzw. $1.7V_1/E_t$ ($F_{2\alpha}$) und für die Rückreaktion $k_4 = 1.4V_2/E_t$ (E_2) bzw. $1.3V_2/E_t$ ($F_{2\alpha}$) und $k_2 = 3.9V_2/E_t$ (E_2, $F_{2\alpha}$). Daher besteht keine Notwendigkeit unter den gegebenen Bedingungen Isomerisierungen binärer Komplexe anzunehmen.

Die Relationen der für PGE$_2$ und $F_{2\alpha}$ unter 4.6.3. angege-

benen Geschwindigkeitskonstanten lassen außerdem eine Aussage über den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion zu. Für die Hinreaktion kommt hierfür am ehesten die Dissoziation des binären Komplexes E·NADH in Frage. Die im Rahmen des Meßfehlers gleichen Maximalgeschwindigkeiten der Hinreaktion für die PG E_2, $F_{2\alpha}$, E_1 und A_1 (Tab.11) stehen hiermit in Einklang. Die geringere Maximalgeschwindigkeit der Endoperoxidanalogen beruht wahrscheinlich auf einer Verlagerung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts auf die Isomerisierung oder Dissoziation des ternären Komplexes. Letzteres gilt auch für die Rückreaktion, wo die mit 15KPGE_2 bzw. 15KPG$F_{2\alpha}$ erhaltenen Maximalgeschwindigkeiten bezeichnenderweise verschieden sind (Baier,1977). Dieser Unterschied in den geschwindigkeitsbestimmenden Schritten könnte auch zu dem stark differierenden Verlauf der pH-Kurven der Hin- und Rückreaktion beitragen.

Die mit 15HPGDH aus Humanplacenta in 100mM TRAP bei pH 7.4 durchgeführten Steady-State Kinetiken der Hin- und Rückreaktion einschließlich der Produktinhibitionsstudien und Messungen mit einem alternativen Substrat, alternativen Produkt und kompetitiven "dead-end"-Inhibitor fügen sich also zwanglos in einen Ordered Bi Bi Mechanismus, solange bei PG, 15KPG und NADH die erwähnten kritischen Konzentrationen nicht überschritten werden. Ein solcher Mechanismus stellt unter diesen "in vitro"-Bedingungen eine ausreichende Beschreibung des kinetischen Verhaltens des Enzyms dar. Die Beurteilung einer Substanz als Substrat oder Inhibitor des Enzyms sollte im Rahmen des Ordered Bi Bi Mechanismus erfolgen. Insbesondere bedarf es zur Angabe von Hemmkonstanten nicht nur ausreichender Informationen zur Art des Inhibitors (reversibel, "dead-end", multipel etc.), sondern auch der genauen Kenntnis des Mechanismus der enzymatischen Reaktion (Fromm,1975). Dies fand in der Literatur über 15HPGDH bisher kaum Beachtung, sodaß Literaturangaben zu Hemmkonstanten von Substratanalogen etc. vorsichtig beurteilt werden sollten.

Die vorliegenden Daten lassen keine eindeutige Aussage zu,

inwieweit ein Ordered Bi Bi Mechanismus das "in vivo"-Verhalten der 15HPGDH aus Humanplacenta wiedergibt. Zwar wurden die "in vitro"-Meßbedingungen unter der Maxime gewählt, physiologischen Bedingungen, soweit überhaupt möglich, Rechnung zu tragen und gezeigt, daß sich die kinetischen Eigenschaften des Enzyms vom 17000xg-Überstand bis zur höchstangereicherten Enzymfraktion nicht ändern. Aus verschiedenen in der Literatur ausreichend diskutierten Gründen ist es allerdings nicht möglich, bei "in vitro"-Messungen mit gereinigten Enzymen physiologische Bedingungen genau zu imitieren (vgl. u.a. Bermeyer,1973). Auf der anderen Seite liegen unseres Wissens bisher keine Messungen vor, die dagegen sprechen, daß auch dem "in vivo"-Verhalten der 15HPGDH kinetisch ein Ordered Bi Bi Mechanismus mit NAD als führendem Substrat zugrunde liegt. Die "in vitro" auftretenden Abweichungen von diesem Mechanismus bei PG-Konzentrationen weit über den K_m^{PG} sollten physiologisch keine Bedeutung haben, da die Konzentrationen primärer PG in den meisten Geweben und Körperflüssigkeiten mit weniger als 10^{-7}M (Änggard,1971) deutlich unter den K_m^{PG} liegen. Die Durchschnittskonzentrationen von PGE_2 bzw. $PGF_{2\alpha}$ in normalen Humanplacenten zwischen 5 und 14ng/g Gewebe (Willman & Collins,1976; Demers & Gabbe,1976) stützen diese Überlegung. Auch falls lokal höhere Konzentrationen auftreten, besteht noch ein ausreichender Spielraum. Ähnliches gilt für die 15KPG.

Die durchschnittliche NADH-Konzentration in reifer Humanplacenta von 0.055µMol/g Gewebe (Villee,1962) dürfte nicht zu einer signifikanten $E(NADH)_2$-Bildung führen. Höhere lokale Konzentrationen könnten zwar eine über die normale Produktinhibition hinausgehende Hemmung der Hinreaktion oder eine Substrathemmung der Rückreaktion ausüben. Eine Regulation der 15HPGDH-Aktivität in der Zelle über das NAD/NADH-Verhältnis ist aber wegen seines Einflusses auf und seiner Beeinflussung durch eine Vielzahl anderer Stoffwechselreaktionen nicht plausibel. Dies gilt, obwohl von der Seite der 15HPGDH her eine solche Regulation durchaus

möglich wäre. Sind die hier ermittelten kinetischen Konstanten wenigsten in ihrer Größenordnung auf physiologische Bedingungen übertragbar, so müßte die in der Zelle üblicherweise ablaufende Hinreaktion nämlich bezüglich NAD mit einem Fünftel bis einem Viertel der bei physiologischen PG-Konzentrationen maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ablaufen[1].

5.7. SUBSTRATBINDUNGSSTELLEN DES ENZYMS

Betrachtet man die Substratbindungsstelle der 15HPGDH für Nucleotide, fällt zunächst auf, daß verglichen mit NAD ($K_s^{NAD} \approx 0.13$mM; Tab.11) NADH eine um ca. eine Zehnerpotenz höhere Affiniät zum Enzym hat ($K_s^{NADH} = K_i^{NADH} \approx 0.01$mM; 4.6.2., Tab.17, Baier,1977). Dies spricht gegen die Aussage von Thaler-Dao et al. (1976), die auf Grund einer fehlenden Hemmung durch Nicotinamidmononucleotid diesen Anteil des NAD von einer Beteiligung an der Bindung ausschließen. Zwar scheint die im Rahmen des Meßfehlers gleiche Affinität von NAD und S-NAD ($K_s^{S\text{-}NAD} \approx 0.1$mM; 4.5.4.) für deren These zu sprechen, jedoch läßt die mit S-NAD im Vergleich zu NAD nur ein Viertel betragende Maximalgeschwindigkeit (4.5.4.) - mit der Dissoziation des NADH als geschwindigkeitsbestimmendem Schritt der Hinreaktion - auf eine, verglichen mit NADH, wesentlich geringere Affinität von S-NADH zum Enzym schließen. Zudem reicht schon der Ersatz der Säureamidgruppe des NAD durch eine Acetylgruppe aus, um eine drastische Senkung der Affinität zu erreichen:

---

[1] Die für eine konstante PG-Konzentration vereinfachte Gleichung der kompetitiven Hemmung der Hinreaktion durch NADH lautet:

$$v = \frac{V_{max}^{NAD} \cdot [NAD]}{K_m^{NAD}{}_{app}(1 + [NADH]/K_i^{NADH}) + [NAD]} .$$

V_{max}^{NAD} und $K_m^{NAD}{}_{app}$ sind Funktionen der PG-Konzentration. Bei sehr kleiner PG-Konzentration gilt für NAD: $K_m app = K_S$. Die durchschnittliche NAD(H)-Konzentration in reifer Humanplacenta beträgt nach Villee (1962) 0.22 (0.055) µMol/g Gewebe. Eine über die normale Produkthemmung hinausgehende NADH-Inhibition kann bei dieser Abschätzung vernachlässigt werden.

nach Marrazzi & Matschinsky (1972) ist für 15HPGDH aus Schweinelunge Ac-NAD weder Substrat noch Inhibitor, während es für das Humanplacentaenzym ein so schwaches Substrat ist, daß auf eine Ermittlung des $K_s^{Ac\text{-}NAD}$ über ein vollständiges Anfangsgeschwindigkeitsmuster verzichtet wurde (4.5.4.). Der hohe $K_m^{Ac\text{-}NAD}$app von 0.7mM läßt jedoch eine sehr geringe Affinität zum Enzym erwarten.

Die Einführung einer Phosphatgruppe in 2'-Stellung der Adenosinribose des NAD führt neben dem Verlust der Umsetzbarkeit zu einer sehr starken Verminderung der Affinität. NADP ist ein nur schwacher Inhibitor der 15HPGDH (Tab.15). Da Adenosindiphosphoribose stärker hemmt als AMP, ADP und ATP (Marrazzi & Matschinsky,1972; Thaler-Dao et al.,1976), die schwache Inhibitoren der 15HPGDH sind, sollte auch die andere Ribose eine gewisse Bedeutung für die Bindung haben. Dies könnte ein Grund sein für das Mißlingen von Affinitätschromatographien mit NAD-Agarosen, bei denen das NAD über die Ribosen immobilisiert wurde (4.2.5.; Nagasawa et al.,1974). Auch der Adeninrest scheint zur Bindung beizutragen (4.2.5.; Marrazzi & Matschinsky,1972).

Es sieht also so aus, als hätten alle Teile des NAD-Moleküls einen mehr oder minder starken Einfluß auf die Wechselwirkung mit der 15HPGDH. Marrazzi & Matschinsky (1972) kommen für das Schweinelungeenzym zu der Aussage: "...the carboxamide group of the nicotinamide portion is less critical for binding than the adenosine portion". Bezüglich der Stereospezifität des Hydrogentransfers am Dinucleotid gehört 15HPGDH aus Humanplacenta zu den Dehydrogenasen des Typs B (Saintot et al.,1976).

Abgesehen vom natürlichen Substrat und Produkt dürfte keines der erwähnten Nucleotide physiologisch eine Bedeutung für die 15HPGDH-Aktivität haben. Limas & Cohn (1973) fanden mit einer 15HPGDH-Präparation aus Hundeherzmuskel, die nur eine spezifische Aktivität von 2.4nMol/minxmg Protein aufwies, eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit auf mehr als das Doppelte durch 10^{-8} bis 10^{-4}M cAMP (NADH-Messung, 3.3% Äthanol i.T.!). Ein ähnlicher Effekt wurde

bisher in der Literatur für keine andere 15HPGDH erwähnt. Die Aktivität hochgereinigter 15HPGDH aus Humanplacenta war im gleichen Konzentrationsbereich durch cAMP und cGMP nicht zu beeinflussen (Tab.14). Erst im Konzentrationsbereich um 10mM konnte mit beiden eine signifikante Hemmung erzielt werden (Tab.14,15).

Aus Tab.11 geht hervor, daß PGE_2, PGE_1 und PGA_1 mit K_s^{PG} zwischen 11 und 15µM zur PG-Gruppe mit höchster Affinität zum E·NAD-Komplex der 15HPGDH gehören. Ein Vergleich der in der Literatur angegebenen K_m^{PGA1}app und K_m^{PGA2}app (Nakano et al.,1969; Schlegel et al.,1974) läßt, unter Berücksichtigung der aus Tab.11 ersichtlichen K_m^{PG}/K_s^{PG}-Relationen, den Schluß zu, daß auch PGA_2 hier einzureihen ist. Der hohe von Thaler-Dao et al. (1974) angegebene $K_m$app von 50µM für PGA_2 gegenüber 8.7µM für PGA_1 und 4.5µM für 10,11-Dihydro-PGA_2 könnte auf einer Verunreinigung durch PGB_2 beruhen, das durch spontane Isomerisierung aus PGA_2 entstehen kann (Hajratwala,1975). Es ist nicht auszuschließen, daß dieser Effekt auch zu einer leichten Überbewertung des K_m^{PGA1} in Tab.11 führte: PGA und PGB werden durch die hier zur Reinheitskontrolle herangezogene Methode kaum voneinander getrennt (Tab.5), sodaß eine geringe Verunreinigung von PGA durch PGB übersehen werden kann.

Unter den in Abb.34 angegebenen Bedingungen muß der hier gegenüber PG kompetitive "dead-end"-Inhibitor PGB_1 mit K_i^{PGB1} = 15µM ebenfalls zu der Gruppe mit hoher Affinität zum E·NAD-Komplex gerechnet werden. Nakano et al. (1969; 15HPGDH aus Schweinelunge) und Jarabak & Braithwaite (1976) geben eine nichtkompetitive Hemmung von PGB gegenüber PG an. Dies würde bedeuten, daß PGB nicht mit der Substratbindungsstelle des E·NAD-Komplexes in Wechselwirkung tritt. Die Messungen wurden allerdings unter anderen Testbedingungen vorgenommen und die Ergebnisse nicht näher dargestellt. Die hohen Hemmkonstanten für PGB_1 von 220µM und PGB_2 von 200µM (Nakano et al.,1969) wurden ohne Kenntnis des Mechanismus der enzymatischen Reaktion ermittelt. Demgegenüber ist die von Jarabak & Braithwaite (1976) angegebene, in

Gegenwart von 19µM PGE_1 und 0.45mM NAD eine 50%ige Hemmung verursachende PGE_1-Konzentration von 49.7µM gut mit K_i^{PGB1} = 15µM vereinbar, wenn man eine kompetitive Hemmung gegenüber PG annimmt.

Die beiden PGE_2-Analogen U-44069 und U-46619, bei denen einer der Endoperoxidsauerstoffe durch eine Methylengruppe ersetzt ist (Bundy,1975; vgl.2.3.1.), sowie $PGF_{2\alpha}$ sind Substrate mit einer mittleren Affinität zur besagten Enzymform (Tab.11). Auch $PGF_{1\alpha}$ sollte zu dieser Gruppe gehören (Nakano et al.,1969; Marrazzi & Matschinsky,1972; Thaler-Dao et al.,1974). Inwieweit auch die ICI-Substanzen, bei denen es sich um im Benzolring substituierte Phenoxy-17,18,19,20-tetranor-Analoge von $PGF_{2\alpha}$ handelt (Binder et al., 1974; vgl. 2.3.1.)[1], bezüglich ihrer Affinität in diese Gruppe einzuordnen sind, bleibt fraglich. Sie sind keine Substrate der 15HPGDH. Nach Tab.13 hemmen ICI 86,384, ICI 86,768, ICI 87,904 und ICI 87,907 im Rahmen des Meßfehlers gleich stark. ICI 86,384 und ICI 87,907 hemmen kompetitiv gegenüber PG, wobei die Hemmung bis höchstens 0.3mM im Rahmen des Meßfehlers linear ist (Abb.37,39,40). Dies wäre mit einem PG-analogen "dead-end"-Inhibitor, der an den E·NAD-Komplex bindet, vereinbar, nicht aber die Abweichung der Hemmung von der Linearität bei hohen Konzentrationen von ICI 87,907 und dessen nichtkompetitive Hemmung bei variablem NAD (Abb.38,39). Nichtlineare Hemmungen treten bei "dead-end"-Inhibitoren auf, wenn Mehrfachbindung an eine Enzymform erfolgt (Cleland,1963b). Eine Erklärungsmöglichkeit für die erhaltenen Ergebnisse wäre, daß, neben der Bindung dieser $PGF_{2\alpha}$-Analogen an die Substratbindungsstelle des E·NAD-Komplexes, bei höheren Konzentrationen über den

---

[1] Entgegen der bei Binder et al. (1974) gezeigten Abbildung handelt es sich gemäß einer persönlichen Mitteilung von Dr. N.S. Crossley (ICI Pharmaceuticals Division, Macclesfield, England) bei ICI 79,939 und ICI 81,008 um Racemate. Die natürlichen Enantiomere sind ICI 87,907 und ICI 86,384.

Benzolring der Analogen auch eine Bindung an eine oder mehrere der erwähnten hydrophoben Bereiche der 15HPGDH eintritt. Auch die Möglichkeit eines zusätzlichen alternativen Reaktionsweges ist nicht auszuschließen. Es mußte deswegen darauf verzichtet werden, Inhibitorkonstanten (K_i) für diese Analogen anzugeben. Weitere Messungen mit den natürlichen Enantiomeren waren in Ermangelung von Substanz nicht möglich.

Eine letzte Gruppe bilden die PG- und PG-Analogen sehr geringer oder fehlender Affinität zum Enzym. Hierzu zählen die 15(S)-15-Methylanalogen von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 und TXB_2, die, wenn überhaupt, erst bei relativ hohen Konzentrationen Effekte zeigen. 15-Methyl-$PGF_{2\alpha}$ und 15-Methyl-PGE_2 sind keine Substrate und je nach Enzympräparation oder Meßbedingungen keine oder sehr schwache kompetitive Inhibitoren der 15HPGDH (Tab.13; Thaler-Dao et al.,1974,1976; Jarabak & Braithwaite,1976). TXB_2 enthält an Stelle des Fünfrings der PG einen sechsgliedrigen zyklischen Halbacetal (Abb.3). In seiner Struktur kommt es von den hier untersuchten PG dem D_2 am nächsten. Nach den in Tab.12 dargestellten Untersuchungen sollte TXB_2 ein Substrat der 15HPGDH aus Humanplacenta sein, mit einer Maximalgeschwindigkeit von sicher weniger als 10% gegenüber der von $PGF_{2\alpha}$. Seine Affinität zur entsprechenden Enzymform ist äußerst gering (Tab.12,13). TXB_2 ist auch ein sehr schwaches Substrat der 15HPGDH aus Affenlunge (Sun,1976).

PGD_2 ist auf Grund der unter 4.5.2. geschilderten Ergebnisse als Substrat der NAD-abhängigen 15HPGDH aus Humanplacenta gesichert. Die bei der Reaktion aus PGD_2 gebildete oberhalb pH 6-7 gelbe Substanz ist das Produkt einer Dehydrogenasereaktion, da sie in Abwesenheit von NAD oder Enzymlösung nicht gebildet wird. Ihre Extrahierbarkeit in organische Lösungsmittel bei pH 3, ihre Dünnschichtchromatogramme und ihr Absorptionsspektrum entsprechen dem Verhalten von auf organisch-chemischem Wege hergestelltem 15KPGD$_2$ (Sun,1976). Die in ihrer Intensität pH-abhängige gelbe Färbung wird durch ein mesomeriestabilisiertes Enolatanion

hervorgerufen, dessen Beteiligung am Gleichgewicht mit der Keto- und Enolform von $15KPGD_2$ bei der Erhöhung des pH-Wertes zunimmt. Seine Bildung wird im Fall von D_2 dadurch ermöglicht, daß die mit der 15-Ketogruppe in Konjugation stehende $\Delta^{13,14}$-Doppelbindung über eine C-H-Gruppe mit der 11-Ketogruppe verbunden ist. Entgegen früheren Ergebnissen hat sich PGD_2 inzwischen auch als schwaches Substrat der 15HPGDH aus Affenlunge erwiesen (Sun et al.,1976; Sun,1976). Das bei pH 8 in 100mM TRAP mit 1mM NAD durch Messung des $15KPGD_2$ bei 420nm ermittelte Lineweaver-Burk-Diagramm war im Rahmen des Meßfehlers zwischen 0.05 und 0.8mM PGD_2 linear (Abb.33). Der daraus erhaltene K_m^{PGD2}app von 0.5mM und die im Vergleich zu $V_{max}^{PGF2\alpha}$ nur 1% betragende V_{max}^{PGD2} weisen PGD_2 als ein sehr schwaches Substrat des Enzyms aus. Obwohl aller Wahrscheinlichkeit nach auch PGD_2 an den E·NAD-Komplex bindet, ist wegen des hohen K_m^{PGD2}app die erhebliche Beteiligung eines alternativen Weges über einen E·PGD_2-Komplex nicht ausgeschlossen.

Aus den hier diskutierten Ergebnissen lassen sich folgende Aussagen über die strukturellen Voraussetzungen für eine Bindung an die PG-Stelle im aktiven Zentrum der 15HPGDH aus Humanplacenta machen. Es fällt auf, daß die PG mit der höchsten Affinität zum E·NAD-Komplex (PG E, A, B) alle eine Ketogruppe in Position 9 des Moleküls besitzen, wodurch C8, C9, C10 und das Heteroatom in einer Ebene liegen. Die 9-Ketogruppe scheint ohne wesentlichen Affinitätsverlust gegen eine Oximgruppe austauschbar zu sein (Thaler-Dao et al.,1976). Eine α-Hydroxylgruppe an dieser Stelle führt zu einer Schwächung der Bindung (PG F_α,D), ebenso wie eine Ketogruppe in Position 11 (PGD). Das Ringsystem des TXB_2 erlaubt nur sehr geringe Wechselwirkungen, während die PG-Endoperoxidanalogen mit ihrer unter der Ringebene liegenden Ätherbrücke eine Affinität im Bereich der PGF aufweisen. Neben der großen Bedeutung des Fünfringsystems und seiner funktionellen Gruppen für die Bindung dürfte auch der Bereich um die 15-Hydroxylgruppe eine Rolle spielen (15(S)-15-Methylanaloge). Eine geringe Bedeutung für die Affinität

sollte die Existenz oder das Fehlen der $\Delta^{5,6}$-Doppelbindung haben. Ähnliches gilt für die bei biologisch aktiven PG verbreitete "Haarnadelkonformation", d.h. die annähernd parallele Anordnung der Seitenketten (Andersen et al.,1976; Langs et al.,1977; DeTitta et al.,1977): das zur Gruppe mit der höchsten Affinität zählende PGB_1 weist eine L-förmige Stellung der Seitenketten auf (DeTitta,1976). Ein Vergleich der K_s-Werte von PGE_1, PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ mit den K_i-Werten ihrer 15-Ketometabolite (Tab.11,17) zeigt außerdem, daß die Relation der Affinitäten dieser PG zum E·NAD-Komplex relativ gut mit der ihrer 15-Ketometabolite zum E·NADH -Komplex übereinstimmt.

Zur Einteilung der PG in Gruppen unterschiedlicher Affinität wurde als bestes Kriterium, soweit verfügbar, die Dissoziationskonstanten (K_s, K_i) herangezogen. Die Beispiele PGB_1 und $PGF_{2\alpha}$ zeigen, daß bezüglich der Umsetzungsgeschwindigkeit, die am besten in den extrapolierten Maximalgeschwindigkeiten zum Ausdruck kommt, andere strukturelle Faktoren als bei der Affinität wichtig sein können. Wie oben erwähnt, sollte bei den PG mit der höchsten Maximalgeschwindigkeit (PG E, F_α und A) die Dissoziation des E·NADH-Komplexes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Hinreaktion sein. Die Konformation dieser PG entspricht einer "Haarnadelanordnung" der Seitenketten, wobei die 15-Hydroxylgruppe vom Zentrum weg nach außen gerichtet ist (DeTitta,1976). PG, bei denen die 15-Hydroxylgruppe weniger gut zugänglich ist, sollten durch Verschiebung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts zur Isomerisierung des zentralen ternären Komplexes eine geringere Maximalgeschwindigkeit aufweisen. Keine Substrate des Enzyms (V_1 = 0) sind die 15(S)-15-Methyl-Analogen und die 16-Phenoxy-Analogen, bei denen voluminöse Gruppen zu einer sterischen Hinderung führen, sowie die PGB, bei denen die 15-Hydroxylgruppe durch die L-förmige Anordnung der Seitenketten ins Innere des Moleküls zeigt (DeTitta,1976). Inwieweit auch die geringeren Umsatzgeschwindigkeiten der beiden PG-Endoperoxid-Analogen, von PGD_2 und TXB_2 auf der Orientierung

der 15-Hydroxylgruppe in Relation zum Gesamtmolekül beruhen, kann erst geklärt werden, wenn für sie Konformationsuntersuchungen vorliegen.

Untersuchungen über strukturelle Voraussetzungen der PG in ihrer Funktion als Substrate oder Inhibitoren der 15HPGDH sind auch insofern interessant als sie Informationen für die Synthese therapeutisch verwendbarer PG-agonistischer Analoge liefern. Neben einer erwünschten Gewebs- und/oder Wirkungsspezifität der Analogen spielt nämlich die Erhöhung ihrer biologischen Halbwertszeiten durch Trennung der strukturellen Notwendigkeiten für Wirkung und Metabolismus durch 15HPGDH eine entscheidende Rolle (Losert,1975; Andersen et al.,1976). Dies gelang bei den hier untersuchten Analogen durch Einführung einer Methylgruppe in 15-Stellung (Weeks et al.,1973; Kimball et al.,1976; Jones,1976) oder Ersatz des endständigen Butylrestes durch eine substituierte Phenoxygruppe (Dukes et al.,1974; Csapo,1974; Csepli & Csapo,1975). 15-Methyl-$PGF_{2\alpha}$ und ICI 81,008 sind bereits in der klinischen Erprobung (Sharma & Hale,1975; Puri et al.,1976; Henriques et al.,1977; Csapo & Moscary,1976a,b). Je nach therapeutischer Zielsetzung kann es interessant sein, ob das Analoge ein wirksamer Inhibitor der 15HPGDH ist oder nicht. Während 15-Methyl-$PGF_{2\alpha}$ dafür eine zu geringe Affinität zum Enzym hat, könnten pharmakologische Dosen zumindest einiger der Phenoxyanalogen "in vivo" den Metabolismus der PGF, der natürlichen PG mit geringer Affinität zur 15HPGDH, vermindern (vgl. 4.5.3.).

5.8. MÖGLICHE BIOLOGISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE RELEVANZ VORGELEGTER KINETISCHER DATEN

Den Zwischenprodukten der PG-Biosynthese, den PG-Endoperoxiden PGG_2 und PGH_2 wird eine im Vergleich zu PG höhere Aktivität in einigen biologischen Systemen zugesprochen (Hamberg et al.,1975a; Gorman et al.,1975; Tuvemo et al., 1976). Wegen ihrer kurzen Halbwertszeit in wäßrigen Medien von ca. 5min (Hamberg et al.,1975a) wurden chemisch stabile PG-Endoperoxid-Analoge synthetisiert (Bundy,1975; Corey

et al.,1975). Die hier als Substrate der 15HPGDH untersuchten PGH_2-Analogen U-44069 und U-46619, bei denen entweder der an C11 oder der an C9 gebundene Peroxidsauerstoff des PGH_2 durch eine Methylengruppe ersetzt ist (vgl. 2.3.1.), haben eine dem PGH_2 annähernd gleiche Geometrie (Bundy, 1975). Ihre Effekte auf Blutblättchenaggregation, Kontraktion der glatten Muskulatur verschiedener Gewebe und "airway resistance" sind denen der PG-Endoperoxide vergleichbar (Gorman,1975; Malmsten,1976; Wasserman,1976; Chijimatsu et al.,1977). Auch ihr Einfluß auf den Blutdruck von Versuchstieren entspricht dem der Endoperoxide, wenn man den bei PGG_2 und PGH_2 zusätzlich auftretenden, abschließenden Blutdruckabfall ihrer Umwandlung in PGE_2 zurechnet (Hamberg et al.,1975a; Rose et al.,1976). Zu dem von Malmsten (1976) beschriebenen Unterschied zwischen den PGH_2-Analogen und PGG_2 in ihrem Einfluß auf die Freisetzung von ^{14}C-Serotonin aus Blutblättchen wurde bisher anscheinend keine nähere Untersuchung veröffentlicht. Hier könnte TXA_2 die eigentlich aktive Substanz sein.

Nach Sun et al. (1976) ist PGH_2 Substrat einer NAD-abhängigen 15HPGDH aus Affenlunge. Es kann angenommen werden, daß PGH_2 wie seine beiden Analogen Substrat des Placentaenzyms und auch anderer 15HPGDH ist, mit den Analogen zumindest in der Größenordnung entsprechenden kinetischen Konstanten. Wenn PGH_2 - wie für Lunge und Blutblättchen beschrieben (Svensson et al.,1975; Hamberg et al.,1974a) und für die Biosynthese des Prostacyclins in Arterienwänden postuliert (Bunting et al.,1976; Moncada et al.,1977; Gorman et al.,1977) - unter bestimmten Bedingungen von der PG-Synthetase freigesetzt wird, könnte sein Abbau durch NAD-abhängige 15HPGDH zum Schutz vor unerwünschten Wirkungen beitragen. Dabei wäre eine enge räumliche Beziehung Synthetase/15HPGDH, wie sie oben diskutiert wurde, förderlich. Dies ist auch insofern interessant, als beim raschen spontanen Zerfall von PGH_2 in wäßrigem Medium neben PGE_2 in erheblichem Maß PGD_2 gebildet wird (Nugteren & Hazelhof,1973; Hamberg et al.,1974b), das in Gegenwart von z.B. Rinder-

serumalbumin sogar den Hauptteil der gebildeten primären PG ausmacht (Hamberg & Fredholm,1976; Christ-Hazelhof et al,1976).

PGD_2 ist u.a. wirksamer bei der Bronchokonstriktion und arteriellen Blutdruckerhöhung als $PGF_{2\alpha}$ (Hamberg et al., 1975a; Jones,1976), kann in bestimmten Geweben zur Steigerung des cAMP-Spiegels beitragen (Mills & MacFarlane,1974; Fredholm & Hamberg,1976) und hemmt die Blutblättchenaggregation in menschlichem Plasma besser als PGE_1 (Smith et al. 1974; Nishizawa et al.,1975). Seine im Vergleich zu anderen PG länger anhaltende Wirkung nach oraler oder intravenöser Verabreichung (Nishizawa et al.,1975) beruht darauf, daß es mit seiner hohen Michaeliskonstante und seiner geringen Maximalgeschwindigkeit (4.5.2.) ein zu schwaches Substrat NAD-abhängiger 15HPGDH ist, als daß sein Abbau auf dem für andere PG üblichen, raschen Weg physiologische Bedeutung haben könnte. Obwohl die Potenz einiger Gewebe zu einer quantitativ bedeutenden PGD_2-Biosynthese bekannt ist (Nugteren & Hazelhof,1973; Blackwell et al.,1975; Oelz et al.,1977), ist sein Eliminationsweg bisher unbekannt.

Das biologisch nur wenig aktive TXB_2 wird durch die sehr rasche, spontane Umwandlung des teilweise hochaktiven PG-Endoperoxid-Metaboliten TXA_2 gebildet (Abb.3; Hamberg et al.,1975b; Needleman et al.,1976; Dawson et al.,1976). Kürzlich wurde die Bildung von 15KTXB_2 (15-Oxothromboxan B_2) bzw. 15K13,14DTXB_2 beschrieben (Dawson et al.,1976; Cockerill et al.,1977). Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß die Metaboliten über den Abbau von TXB_2 durch NAD-abhängige 15HPGDH entstanden sind. TXB_2 ist ein zu schwaches Substrat dieses Enzyms (4.5.2.; Sun,1976). Damit übereinstimmend fand Kindahl (1977) als Hauptmetabolit von ^{3}H-TXB_2 im Urin von Affen Dinor-TXB_2, gefolgt von unverändertem TXB_2.

TXB_2 und PGD_2 haben eine zu geringe Affinität zu NAD-abhängiger 15HPGDH, um den Hauptabbauweg der PG E, F und A an dieser Stelle zu beeinträchtigen. Ein solcher Effekt wäre allerdings bei pharmakologischen Untersuchungen mit den

PGH_2-Analogen U-44069 und U-46619 denkbar, da sie eine eher etwas höhere Affinität zum Enzym als $PGF_{2\alpha}$ aufweisen (Tab. 11). Bei solchen Untersuchungen muß auch einkalkuliert werden, daß diese chemisch stabilen PGH_2-Analogen biochemisch zu ihren 15-Ketometaboliten abgebaut werden können, deren pharmakologische Aktivität bisher unbekannt ist.

Für die Beurteilung von Ergebnissen zur biologischen oder pharmakologischen Aktivität von 15KPG kann umgekehrt ihre Umwandlung in PG durch eine im Testorganismus oder Testsystem vorhandene aktive 15HPGDH wichtig sein. Auf Grund der für 15HPGDH aus Humanplacenta vorgelegten kinetischen Daten ist eine Rückreaktion dann möglich, wenn hohe 15KPG-Konzentrationen eingesetzt werden (vgl. Wilks,1977) und dadurch die Produkthemmung der Rückreaktion durch endogene PG, die eine wesentlich höhere Affinität zum Enzym haben als die 15KPG (Tab.11,17), überwunden wird. Dies auch deswegen, weil allein von der Seite der Dinucleotide aus betrachtet die Rückreaktion bevorzugt wäre (Tab.11; 4.6.2.; Baier,1977), selbst wenn, wie in Humanplacenta, die durchschnittliche NAD-Konzentration viermal höher als die durchschnittliche NADH-Konzentration ist (Villee,1962). Nach ersten vorliegenden Ergebnissen zu einer NADH-abhängigen 15KPG-$\Delta^{13,14}$-Reduktase (Westbrook & Jarabak,1975) sind solche Überlegungen auch in Gegenwart dieses Enzyms gültig, besonders wenn sie, wie in reifer Humanplacenta, in deutlich geringeren Konzentrationen als NAD-abhängige 15HPGDH vorliegt (Westbrook & Jarabak,1975; Keirse & Turnbull, 1975). Eine 15HPGDH-Rückreaktion könnte z.B. bei den Ergebnissen von Boot et al. (1976) eine Rolle spielen, die fanden, daß die relaxierende Wirkung von $15KPGE_2$ auf glatte Muskulatur der Luftwege "in vivo" viermal höher ist als "in vitro". Physiologische Bedeutung kann dieser Rückreaktion allerdings kaum beigemessen werden, weil eine entsprechende Ansammlung von 15KPG in Geweben nicht zu erwarten ist (Hansen,1976).

Im Gegensatz dazu ist die Hinreaktion der 15HPGDH, die die Inaktivierung der PG E, F und A einleitet, sowohl pharma-

kologisch als auch physiologisch von erheblichem Interesse (Losert,1975). Dabei fällt auf, daß im Vergleich zu den, abgesehen von Samenflüssigkeit, äußerst niedrigen endogenen PG-Konzentrationen in Geweben und Körperflüssigkeiten (Änggard,1971; Dray & Charbonnel,1974; Dray & Frydman,1976; Willman & Collins,1976) die Michaeliskonstanten der PG für NAD-abhängige 15HPGDH sehr hoch sind (Tab.11). Vorausgesetzt, daß diese Konstanten auch "in vivo" gültig sind, arbeitet das Enzym in der Zelle um Zehnerpotenzen unter den extrapolierten Maximalgeschwindigkeiten für die PG im quasi-linearen Bereich der Michaelis-Menten-Kurve (1/v gegen 1/[PG]). Hier geht mit einer Steigerung der PG-Konzentration eine proportionale Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit einher[1]. Die im Vergleich zu den endogenen PG-Konzentrationen enorme 15HPGDH-Kapazität in Placenta, Lunge, Niere etc. (Änggard et al.,1971; Jarabak,1972; Sun et al., 1976) wird also normalerweise nur wenig genutzt. Sie steht aber bei plötzlicher Erhöhung des PG-Spiegels durch endogene Faktoren oder äußere Eingriffe augenblicklich zur Verfügung. Damit übereinstimmend sind im Laufe von Wehen oder $PGF_{2\alpha}$-Infusionen die Konzentrationen der $PGF_{2\alpha}$-Metabolite im peripheren Blutplasma wesentlich stärker erhöht als die von $PGF_{2\alpha}$ selbst (Henman et al.,1974; Gréen et al., 1974; Gréen,1973; Cornette et al.,1974). Die schnelle PG-Inaktivierung bei der Lungenpassage paßt ebenfalls in dieses Bild (Ferreira & Vane,1967; Piper et al.,1970; Hook & Gillis,1975). Dies zeigt die von ihrem kinetischen Verhalten her hohe Eignung NAD-abhängiger 15HPGDH als Schutzfaktor vor überschießender PG-Wirkung und ihrem Übergreifen auf andere Zellen bzw. Gewebe.

Besonders gilt das für reife Humanplacenta, die der Hauptplatz des PG-Metabolismus in der uteroplacentalen Einheit ist,mit den in diesem Bereich geringsten PG-Konzentrationen (Willman & Collins,1976). NAD-abhängige 15HPGDH bildet hier

[1] Solche Überlegungen gelten für die Zelle auch falls die Enzymkonzentration nicht mehr klein gegenüber der Substratkonzentration ist (Dynamischer Steady-State, Cleland,1970).

eine Barriere, die nicht nur den Föten im letzen Teil der Schwangerschaft und besonders während der Wehen vor in Decidua und/oder Myometrium vermehrt synthetisierten PG schützen kann (Goldberg & Ramwell,1975), sondern umgekehrt auch den mütterlichen Organismus vor PG fötalen Ursprungs (Tuvemo & Wide,1973; Alexander & Gimbrone,1976; Keirse & Turnbull,1976). Dies könnte eine bezüglich der PG getrennte Regulation von z.B. Uteruskontraktion auf der einen und Tonus der Nabelschnur bzw. Ductus arteriosus Botalli auf der anderen Seite ermöglichen (Goldberg & Ramwell,1975, Tuvemo & Wide,1973; Strandberg & Tuvemo,1975; Coceani et al.,1976; Clyman et al.,1977). In peripherem mütterlichem Blutplasma wurden geringere $PGF_{2\alpha}$- und 15K13,14D$PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen gefunden als im Plasma der Nabelschnurarterie und Nabelschnurvene (Challis et al.,1974; Haning et al., 1977).

Von der Funktion der 15HPGDH ist PGE_2 weit stärker betroffen als $PGF_{2\alpha}$. Für beide wurde zwar mit NAD-abhängiger 15HPGDH aus Humanplacenta die gleiche extrapolierte Maximalgeschwindigkeit ermittelt (Tab.11), der gegenüber $K_m^{PGF2\alpha}$ um ca. eine Zehnerpotenz niedrigere K_m^{PGE2} führt aber eingedenk der endogenen PGE_2- und $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen (Willman & Collins,1976; Demers & Gabbe,1976) zu einer entsprechend größeren aktuellen Reaktionsgeschwindigkeit bei PGE_2. Dies wurde von Keirse & Turnbull (1975) für Humanplacentahomogenate bestätigt. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang, daß PGE_2 bei der Kontraktion des Uterus von Schwangeren ca. zehnmal aktiver als $PGF_{2\alpha}$ ist (Gorman,1975; Barden,1977), während $PGF_{2\alpha}$ bei einigen Säugetieren höhere luteolytische Aktivität aufweist (Labhsetwar,1972,1974). Nach Keirse et al. (1974) und Dray & Frydman (1976) kommt es im Fruchtwasser im Verlauf der Wehen, unter Erhöhung des Spiegels beider PG, zu einer Umkehr des $PGE_2/PGF_{2\alpha}$-Verhältnisses zugunsten von $PGF_{2\alpha}$. Theoretisch könnte die verglichen mit PGE_2 langsamere Dehydrierung von $PGF_{2\alpha}$ zu einer Änderung dieses Konzentrationsverhältnisses entscheidend beitragen. Die im Vergleich zu PGE_2 geringe Affinität

von $PGF_{2\alpha}$ für 15HPGDH dürfte auch zu einer stärkeren Beeinflussung des $PGF_{2\alpha}$-Metabolismus durch gegenüber PG kompetitive Inhibitoren führen.

Im Laufe der hier geführten Diskussion wurde mehrfach davon ausgegangen, daß die in fast allen Säugetiergeweben vorkommende NAD-abhängige 15HPGDH keine allzu große Organ- und Speziesspezifität aufweist. Zwar ist das Humanplacentaenzym labiler als die Enzyme aus Schweine- und Rinderlunge (Jarabak,1972), jedoch lassen sich alle drei durch tiefe Temperaturen, Glycerin, Thiole, NAD und hohe Salzkonzentrationen stabilisieren (Jarabak,1972; Marrazzi & Matschinsky, 1972; Marrazzi & Andersen,1974; Rückrich,1974; Tab.7). Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Meßbedingungen wurden für Enzyme verschiedener Quellen vergleichbare pH-Optima und isoelektrische Punkte ermittelt (Änggard,1971; Matschinsky et al.,1974; Yamazaki & Sasaki,1974; Baier, 1977; 4.4.4.; Hansen,1976; Hassid & Levine,1977). Die Molekulargewichtsangaben für NAD-abhängige 15HPGDH eines Gewebes variieren stärker als die für Enzyme verschiedener Gewebe (Hansen,1976). Ähnliches gilt für Substratspezifität und kinetische Konstanten, wo differierende Angaben eher auf unterschiedlichen Meßbedingungen beruhen (Marrazzi & Matschinsky,1972; Marrazzi & Andersen,1974; Hansen,1976; Thaler-Dao et al.,1976; Sun et al.,1976). Sulfhydrylblocker (Pace-Asciak et al.,1970; Thaler-Dao et al.,1974), Schilddrüsenhormone (Tai et al.,1974; Lee & Levine,1975; Thaler-Dao et al.,1976), Carbenoxalon (Tab.10; Peskar et al., 1976), Ethacrynsäure (Tai & Hollander,1976a; Jarabak & Braithwaite,1976), Indomethacin (Flower,1974; Hansen,1974; Lee & Levine,1975) u.a. hemmen die Enzyme verschiedener Quellen in vergleichbarem Ausmaß. Auf Grund der geringen Organ- und Speziesspezifität NAD-abhängiger 15HPGDH sind die in dieser Dissertation für ein Enzym aus reifer Humanplacenta vorgelegten Ergebnisse zum großen Teil auf andere NAD-abhängige 15HPGDH übertragbar.

6. ZUSAMMENFASSUNG

NAD-abhängige 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase wurde aus reifer Humanplacenta (Konzentration: 1-2µg/g Gewebe), bezogen auf den 17000xg-Überstand des Placentahomogenats, fast 10000-fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 43 IU/mg Protein angereichert, wobei eine 10%ige Ausbeute erzielt wurde. Analytische Disk-Elektrophoresen in Polyacrylamidgel zeigten eine Proteinbande. Diese korrespondierte mit einer entsprechenden Aktivitätsanfärbung. Die Proteinanfärbung war jedoch auf Grund der geringen Proteinkonzentration zu schwach, um als entgültiger Beweis für die völlige elektrophoretische Reinheit des Enzyms herangezogen werden zu können. Die höchstangereicherten Enzymfraktionen enthielten keine die Hin- oder Rückreaktion des Enzyms störenden enzymatischen Fremdaktivitäten.

Mit Phenyl- und Octyl-Sepharose CL-4B ging das Enzym starke hydrophobe Wechselwirkungen ein. Eine Lipidfraktion und nichtionische Detergenzien führten bei fast sättigenden Substratkonzentrationen zu einer signifikanten Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit. Diese war für Triton X-100 im Bereich seiner kritischen Micellenkonzentration halbmaximal. In Gegenwart von 0.1% Triton X-100 waren neben den Maximalgeschwindigkeiten auch die scheinbaren Michealiskonstanten für NAD und PG erhöht.

Durch Gelfiltration über Sephadex G-100 wurde für das hochangereicherte Enzym ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 52000 ermittelt.

Die Bedingungen des enzymatischen Tests wurden für enzymkinetische Studien optimiert. Systematische Untersuchungen des konzentrationsabhängigen Einflusses verschiedener Puffer und Salze auf die enzymatische Aktivität wurden vorgenommen. Die pH-Abhängigkeiten der Hinreaktion in 100mM Triäthanolaminpuffer (TRAP) bei 37°C zeigten in Gegenwart fast sättigender Substratkonzentrationen ein Plateau zwischen pH 6.9 und 7.7 und ein scharfes Maximum bei ca. pH 9.5. Das pH-Maximum der Rückreaktion, die oberhalb pH 9

nicht mehr meßbar war, lag unter pH 6 (kein Plateau). Die in 100mM TRAP bei pH 7.4 von 20 bis 37°C gemessene Temperaturabhängigkeit führte zu einem linearen Arrhenius-Diagramm, aus dem eine molare Aktivierungsenthalpie von ca. 13kcal/Mol errechnet wurde. Für kinetische Untersuchungen wurden als Bedingungen 100mM TRAP, pH 7.4 und 37°C gewählt.

Die NAD/PG-Anfangsgeschwindigkeitsmuster führten zu konvergierenden doppelt reziproken Primärdiagrammen, die im Rahmen des Meßfehlers bis mindestens $100xK_m^{NAD}$ bzw. $10xK_m^{PG}$ linear waren. Durch gewichtete lineare Regressionsanalyse mit einem CDC-3300-Computer wurden die in Tab.11 zusammengefaßten kinetischen Konstanten für NAD bzw. $PGF_{2\alpha}$, PGE_2, PGE_1, PGA_1 und zwei PGH_2-Analoge ermittelt. Mit diesen PG waren die Dissoziationskonstanten für NAD nicht signifikant verschieden. PGD_2, Thionicotinamid- und 3-Acetylpyridin-adenindinucleotid waren ebenfalls Substrate des Enzyms.

PGB_1 erwies sich als ein gegenüber PG kompetitiver "dead-end"-Inhibitor. Zwei substituierte 17,18,19,20-Tetranor-16-Phenoxy-$PGF_{2\alpha}$-Analoge hemmten ebenfalls kompetitiv gegenüber PG, können aber auf Grund näherer Untersuchungen nicht als einfache "dead-end"-Inhibitoren angesehen werden. 15(S)-15-Methyl-PGE_2 und -$PGF_{2\alpha}$, Thromboxan B_2, NADP, NADPH, AMP, cAMP, cGMP, Phorbol, Methergin^R, Adrenalin, Hydroxymethoxymandelsäure, Homovanillinsäure u.a. waren keine oder nur relativ schwache Inhibitoren der enzymatischen Reaktion. In Gegenwart von 0.1mM NAD und 0.1mM $PGF_{2\alpha}$ erfolgte eine 50%ige Hemmung der Hinreaktion durch 0.14mM Carbenoxalon.

Die Produkthemmung der Hinreaktion durch NADH war kompetitiv gegenüber NAD und nichtkompetitiv gegenüber PG. 15-Keto-PG zeigten gegenüber den entsprechenden PG und NAD nichtkompetitive Hemmungen. Das Produktanaloge 15-Keto-13,14-dihydro-$PGF_{2\alpha}$ hemmte nichtkompetitiv gegenüber $PGF_{2\alpha}$. Die Konkurrenz von Thionicotinamid-adenin-dinucleotid mit NAD um das Enzym führte, bei 342nm gemessen und gegen die reziproke PG-Konzentration aufgetragen, zu einer nichtlinearen Hemmung.

Das Anfangsgeschwindigkeitsmuster der Rückreaktion mit NADH und 15-Keto-PGE_2 ergab konvergierende doppelt reziproke Primärdiagramme, die bis mindestens $20xK_m^{NADH}$ und $10xK_m^{15KPGE2}$ linear waren. Der K_s^{NADH} war nicht signifikant verschieden von den K_i^{NADH} der Produkthemmungen der Hinreaktion.

PGE_1 zeigte oberhalb $20xK_m$ Substrathemmung. Das Phänomen einer "Substrataktivierung" wurde für $PGF_{2\alpha}$ bzw. PGE_2 oberhalb $20xK_m$ bzw. $100xK_m$ signifikant. Die Produkthemmung von 15-Keto-PGE_2 gegenüber NAD war auch in Gegenwart einer festen PGE_2-Konzentration von über $100xK_m$ nichtkompetitiv. Über $40xK_m$ zeigte NADH eine signifikante Substrathemmung der Rückreaktion. Diese unter relativ extremen Bedingungen gefundenen Abweichungen vom unten vorgeschlagenen Mechanismus wurden diskutiert.

Für den Konzentrationsbereich unterhalb der erwähnten kritischen Substratkonzentrationen, der allein von praktischer Bedeutung ist, sind die Ergebnisse der enzymkinetischen Studien durch folgende Aussage zu beschreiben: NAD-abhängige 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase aus reifer Humanplacenta folgt kinetisch einem Ordered Bi Bi Mechanismus nach der Definition von Cleland (1970) mit NAD als führendem Substrat der Hinreaktion und NADH als führendem Substrat der Rückreaktion. Die Relationen der für diesen Mechanismus für E_2 und $F_{2\alpha}$ errechneten Geschwindigkeitskonstanten lassen folgende Schlüsse zu: 1.) Es besteht keine Notwendigkeit Isomerisierungen binärer Komplexe anzunehmen. 2.) Zumindest für einige PG ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Hinreaktion die Dissoziation des E·NADH-Komplexes.

Strukturelle Voraussetzungen zur Bindung an die entsprechenden Substratstellen des Enzyms sowie die mögliche pharmakologische oder physiologische Relevanz einer Reihe der erhaltenen Daten wurden diskutiert.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Abdel-Halim,M.S., Hamberg,M., Sjöquist,B. & Änggard,E. (1977) Prostaglandins 14, 633-643.

Alam,N.A., Russell,P.T., Tabor,M.W. & Moulton,B.C. (1976) Endocrinology 98, 859-863.

Alberty,R.A. (1954) J.Am.Chem.Soc. 76, 2494-2498.

Alberty,R.A. & Massey,V. (1954) Biochim.Biophys.Acta 13, 347-353.

Alberty,R.A., Massey,V., Frieden,C. & Fuhlbrigge,A.R. (1954) J.Am.Chem.Soc. 76, 2485-2493.

Alexander,R.W. & Gimbrone,M.A. (1976) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 78, 1617-1620.

Andersen,N.H. (1969) J.Lipid Res. 10, 316-319.

Andersen,N.H., Ramwell,P.W., Leovey,E.M.K. & Johnson,M. (1976) in Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 1 (Samuelsson,B. & Paoletti,R., Hrsg.) S.271-289, Raven Press, New York.

Anderson,G.G. (1973) Prostaglandins 4, 765-774.

Anderson,G.G. & Speroff,L. (1973) in The Prostaglandins 1 (Ramwell,P.W., Hrsg.) S.365-389, Plenum Press, New York, London.

Andrews,P. (1964) Biochem.J. 91, 222-233.

Andrews,P. (1970) Methods Biochem.Analysis 18, 1-53.

Änggard,E. (1966) Acta Physiol.Scand. 66, 509-510.

Änggard,E. (1971) Ann.N.Y.Acad.Sci. 180, 200-217.

Änggard,E. & Larsson,C. (1971) Eur.J.Pharmac. 14, 66-70.

Änggard,E. & Samuelsson,B. (1966) Ark.Kemi 25, 293-300.

Änggard,E., Larsson,C. & Samuelsson,B. (1971) Acta Physiol. Scand. 81, 396-404.

Änggard,E., Bohman,S.-O., Griffin III,J.E., Larsson,C. & Maunsbach,A.B. (1972) Acta Physiol.Scand. 84, 231-246.

Armstrong,J.M., Blackwell,G.J., Flower,R.J., McGiff,J.C., Mullane,K.M. & Vane,J.R. (1976) Nature 260, 582-586.

Attallah,A.A. & Schussler,G.G. (1973) Prostaglandins 4, 479-484.

Attallah,A.A., Payakkapan,W. & Lee,J.B. (1974a) Life Sci. 14, 1521-1534.

Attallah,A.A., Payakkapan,W., Lee,J.B., Carr,A. & Brazelton,E. (1974b) Prostaglandins 5, 69-72.

Attallah,A.A., Duchesne,M.J. & Lee,J.B. (1975) Life Sci. 16, 1743-1752.

Baginski,E.S., Foa,P.P. & Zak,B. (1970) in Methoden der Enzymatischen Analyse 2 (Bergmeyer,H.U., Hrsg.) S.839-843, Verlag Chemie, Weinheim.

Baier,W. (1977) Biochem. Diplomarbeit, Univ. Tübingen

Banaszak,L.J. & Bradshaw,R.A. (1975) in The Enzymes 11A (Boyer,P.D., Hrsg.) S.369-396, Academic Press, New York, London.

Bangham,A.D. & Dawson,R.M.C. (1958) Nature 182, 1292-1293.

Barden,T.P. (1977) in The Prostaglandins 3 (Ramwell,P.W., Hrsg.) S.109-133, Plenum Press, New York, London.

Bartmann,W. (1975) Angew.Chem. 87, 143-151.

Bende,H. (1974) Chemie in unserer Zeit 8, 17-25.

Bergmeyer,H.U. (1970) Methoden der Enzymatischen Analyse 1, Verlag Chemie, Weinheim.

Bergmeyer,H.U. (1973) Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11, 39-45.

Bergström,S. (1967) Science 157, 382-391.

Bergström,S., Carlson,L.A. & Weeks,J.R. (1968) Pharmac.Rev. 20, 1-48.

Bernhard,S.A. & MacQuarrie,R.A. (1973) J.Mol.Biol. 74, 73-78.

Binder,D., Bowler,J., Brown,E.D., Crossley,N.S., Hutton,J., Senior,M., Slater,L., Wilkinson,P. & Wright,N.C.A. (1974) Prostaglandins 6, 87-90.

Blackwell,G.J., Flower,R.J. & Vane,J.R. (1975) Biochim. Biophys.Acta 398, 178-190.

Blume,R. (1973) Univ. Tübingen, persönliche Mitteilungen.

Bohman,S.-O. & Larsson,C. (1975) Acta Physiol.Scand. 94, 244-258.

Boot,J.R., Dawson,W. & Harvey,J. (1976) in Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 2 (Samuelsson,B. & Paoletti,R., Hrsg.) S.958, Raven Press, New York.

Boot,J.R., Dawson,W., Cockerill,A.F., Mallen,D.N.B. & Osborne,D.J. (1977) Prostaglandins 13, 927-932.

Braithwaite,S.S. & Jarabak,J. (1974a) Endocrinology 94, A-112.

Braithwaite,S.S. & Jarabak,J. (1974b) Fed.Proc. 33, 1570.

Braithwaite,S.S. & Jarabak,J. (1975) J.Biol.Chem. 250, 2315-2318.

Braun,P.E. & Radin,N.S. (1969) Biochemistry 8, 4310-4318.

Brenner,W.E., Dingfelder,J.R., Stanrovsky,L.G. & Hendricks, C.H. (1973) Prostaglandins 4, 819-836.

Bruni,A., van Dijck,P.W.M. & de Gier,J. (1975) Biochim. Biophys.Acta 406, 315-328.

Bundy,G.L. (1975) Tetrahedron Lett. 24, 1957-1960.

Bunting,S., Gryglewski,R., Moncada,S. & Vane,J.R. (1976) Prostaglandins 12, 897-913.

Bygdeman,M., Gréen,K., Toppozada,M., Wiqvist,M. & Bergström,S. (1974) Life Sci. 14, 521-531.

Cagen,L.M., Fales,H.M. & Pisano,J.J. (1976) J.Biol.Chem. 251, 6550-6554.

Caton,M.P.L. (1971) Prog.Med.Chem. 8, 317-376.

Challis,J.R.G., Osathanondh,R., Ryan,K.J. & Tulchinsky,D. (1974) Prostaglandins 6, 281-288.

Chan,J.A., Nagasawa,M., Takeguchi,C. & Sih,C.J. (1975) Biochemistry 14, 2987-2991.

Chappèlet-Tordo,D., Fosset,M., Iwatsubo,M., Gache,C. & Lazdunski,M. (1974) Biochemistry 13, 1788-1795.

Chijimatsu,Y., Nguyen,T.V. & Said,S.J. (1977) Prostaglandins 13, 909-926.

Christ,E.J. (1970) Fette Seifen 72, 849-853.

Christ-Hazelhof,E., Nugteren,D.H. & van Dorp,D.A. (1976) Biochim.Biophys.Acta 450, 450-461.

Cleland,W.W. (1963a) Biochim.Biophys.Acta 67, 104-137.

Cleland,W.W. (1963b) Biochim.Biophys.Acta 67, 173-187.

Cleland,W.W. (1963c) Nature 198, 463-465.

Cleland,W.W. (1970) in The Enzymes 2, 3.Aufl. (Boyer,P.D., Hrsg.) S.1-65, Academic Press, New York, London.

Clyman,R.J., Heymann,M.A. & Rudolph,A.M. (1977) Prostaglandins 13, 219-223.

Coceani,F., Olley,P.M. & Bodach,E. (1976) in Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 1 (Samuelsson,B. & Paoletti,R., Hrsg.) S.417-427, Raven Press, New York.

Cockerill,A.F., Mallen,D.N.B., Osborne,D.J., Boot,J.R. & Dawson,W. (1977) Prostaglandins 13, 1033-1042.

Corey,E.J., Nicolaou,K.C., Machida,Y., Malmsten,C.L. & Samuelsson,B. (1975) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 72, 3355-3358.

Cornette,J.C., Harrison,K.L. & Kirton,K.T. (1974) Prostaglandins 5, 155-164.

Crutchley,D.J. & Piper,P.J. (1975) Brit.J.Pharmac. 54, 397-399.

Csapo,A.J. (1974) Prostaglandins 7, 141-148.

Csapo,A.J. & Moscary,P. (1976a) Prostaglandins 11, 155-162.

Csapo,A.J. & Moscary,P, (1976b) Prostaglandins 12, 455-461.

Csepli,J. & Csapo,A.J. (1975) Prostaglandins 10, 689-697.

Dalziel,K. (1957) Acta Chem.Scand. 11, 1706-1723.

Dawson,W., Lewis,R.L., McMahon,R.E. & Sweatman,W.J.F. (1974) Nature 250, 331-332.

Dawson,W., Boot,J.R., Cockerill,A.F., Mallen,D.N.B. & Osborne,D.J. (1976) Nature 262, 699-702.

de Deckere,E.A.M., Nugteren,D.H. & TenHoor,F.T. (1977) Nature 268, 160-163.

Demers,L.M. & Gabbe,S.G. (1976) Am.J.Obstet.Gynecol. 126, 137-139.

DeTitta,G.T. (1976) Science 191, 1271-1272.

DeTitta,G.T., Erman,M., Fortier,S., Fronckowiak,M. & Langs,D. (1977) Prostaglandins 14, 591-594.

Dickman,Z. & Spilman,C.H. (1975) Science 190, 997-998.

Dixon,M. (1953a) Biochem.J. 55, 161-170.

Dixon,M. (1953b) Biochem.J. 55, 170-171.

Dixon,M. & Webb,E.C. (1967) Enzymes, 2.Aufl., Longmans, London.

van Dorp,D.A. (1969) Naturwissenschaften 56, 124-130.

Dray,F. & Charbonnel,B. (1974) Prostaglandins 5, 173-174.

Dray,F. & Frydman,R. (1976) Am.J.Obstet.Gynecol. 126,13-19.

Dukes,M., Russel,W. & Walpole,A.L. (1974) Nature 250, 330-332.

Egan,R.W., Paxton,J. & Kuehl,F.A.,Jr. (1976) J.Biol.Chem. 251, 7329-7335.

Ellis,G. & Goldberg,D.M. (1972) Clin.Chim.Acta 39, 472-474.

von Euler,U.S. (1935) Klin.Wochenschrift 14, 1182-1183.

von Euler,U.S. & Eliasson,R. (1967) in Medicinal Chemistry 8, (de Stevens,G., Hrsg.) S.1-164, Academic Press, New York, London.

Ferreira,S.H. & Vane,J.R. (1967) Nature 216, 868-873.

Flamenbaum,W. & Kleinman,J.G. (1977) in The Prostaglandins 3 (Ramwell,P.W., Hrsg.) S.267-328, Plenum Press, New York, London.

Flodin,P., Gelotte,B. & Porath,J. (1960) Nature 188, 493-494.

Flower,R.J. (1974) Pharmac.Rev. 26, 33-67.

Flower,R.J., Cheung,H.S. & Cushman,D.W. (1973) Prostaglandins 4, 325-341.

Fredholm,B.B. & Hamberg,M. (1976) Prostaglandins 11, 507-518.

Friedman,Y., Lang,M. & Burke,G. (1975) Biochim.Biophys. Acta 397, 331-341.

Frisell,W.R. (1971) Arch.Biochem.Biophys. 142, 213-222.

Frölich,J.C., Williams,W.M., Sweetman,B.J., Smigel,M., Carr,K., Hollifield,J.W., Fleisher,S., Nies,A.S., Frisk-Holmberg,M. & Oates,J.A. (1976) in Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 1 (Samuelsson,B. & Paoletti, R., Hrsg.) S.65-80, Raven Press, New York.

Fromm,H.J. (1975) Initial Rate Enzyme Kinetics in Molecular Biology Biochemistry and Biophysics 22, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Fromm,H.J. (1977) Iowa State University, persönliche Mitteilungen.

Gabriel,O. (1971) Methods Enzymol. 22, 578-604.

Garen,G. & Levinthal,C. (1960) Biochim.Biophys.Acta 38, 470-483.

Goldberg,V.J. & Ramwell,P.W. (1975) Physiol.Rev. 55, 325-351.

Good,N.E. & Izawa,S. (1972) Methods Enzymol. 24B, 53-68.

Gorman,R.R. (1975) J.Cycl.Nucl.Res. 1, 1-9.

Gorman,R.R., Hamberg,M. & Samuelsson,B. (1975) J.Biol.Chem. 250, 6460-6463.

Gorman,R.R., Bunting,S. & Miller,O.V. (1977) Prostaglandins 13, 377-388.

Gotterer,G.S. (1967a) Biochemistry 6, 2139-2146.

Gotterer,G.S. (1967b) Biochemistry 6, 2147-2152.

Granström,E. & Kindahl,H. (1976) Prostaglandins 12,759-783.

Granström,E. & Samuelsson,B. (1971) J.Biol.Chem. 246, 5254-5263.

Gréen,K. (1973) Adv.Biosci. 9, 91-108.

Gréen,K. & Samuelsson,B. (1964) J.Lipid Res. 5, 117-120.

Gréen,K., Bygdeman,M., Toppozada,M. & Wiqvist,N. (1974) Am.J.Obstet.Gynecol. 120, 25-31.

Gross,K.B. & Gillis,C.N. (1976) Life Sci. 19, 1653-1662.

Hafeti,Y. & Hanstein,W.G. (1969) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 62, 1129-1136.

Hägele,E. (1977) Biochem. Dissertation, Univ. Tübingen.

Hajratwala,B.R. (1975) Austral.J.Pharmac.Sci. 2, 39-41.

Hamberg,M. (1973) Adv.Biosci. 9, 847-850.

Hamberg,M. (1974) Life Sci. 14, 247-252.

Hamberg,M. & Fredholm,B.B. (1976) Biochim.Biophys.Acta 431, 189-193.

Hamberg,M. & Israelsson,U. (1970) J.Biol.Chem. 246, 5107-5114.

Hamberg,M. & Samuelsson,B. (1971) J.Biol.Chem. 246, 6713-6721.

Hamberg,M. & Samuelsson,B. (1973) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 70, 899-903.

Hamberg,M. & Samuelsson,B. (1974) Biochem.Biophys.Res. Commun. 61, 942-949.

Hamberg,M., Svensson,J. & Samuelsson,B. (1974a) Proc.Nat. Acad.Sci. USA 71, 3824-3828.

Hamberg,M., Svensson,J., Wakabayashi,T. & Samuelsson,B. (1974b) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 71, 345-349.

Hamberg,M., Hedqvist,P., Strandberg,K., Svensson,J. & Samuelsson,B. (1975a) Life Sci. 16, 451-462.

Hamberg,M., Svensson,J. & Samuelsson,B. (1975b) Proc.Nat. Acad.Sci. USA 72, 2994-2998.

Haning,R.V., Kieliszek,F.X., Alberimo,S.P. & Speroff,L. (1977) Prostaglandins 13, 455-477.

Hansen,H.S. (1974) Prostaglandins 8, 95-105.

Hansen,H.S. (1976) Prostaglandins 12, 647-679.

Hassid,A. & Levine,L. (1977) Prostaglandins 13, 503-516.

Hawkins,M. & Lipton,J.M. (1977) Prostaglandins 13, 209-218.

Hedge,G.A. (1977) Life Sci. 20, 17-34.

Heinzel,W. (1960) Verh.Deut.Ges.Innere Med. 66, 636-637.

Helenius,A. & Simons,K. (1972) J.Biol.Chem. 247, 3656-3661.

Hemler,M., Lands,W.E.M. & Smith,W.L. (1976) J.Biol.Chem. 251, 5575-5579.

Henman,J.F., Johnson,D.A., Newton,J.R. & Collins,W.P. (1974) Prostaglandins 5, 531-541.

Henriques,E.S., Etkin,R.H., Lee,J.D. & Swartz,D.P. (1977) Prostaglandins 13, 183-191.

Hensby,C.N. (1975) Biochim.Biophys.Acta 409, 225-234.

Hinman,J.W. (1972) Ann.Rev.Biochem. 41, 161-178.

Hong,S.-C.L. & Levine,L. (1976) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 73, 1730-1734.

Hong,S.-C.L., Wheless,C.M. & Levine,L. (1977) Prostaglandins 13, 271-279.

Honn,K.V. & Chavin,W. (1976a) Biochem.Biophys.Res.Commun. 72, 1319-1326.

Honn,K.V. & Chavin,W. (1976b) Biochem.Biophys.Res.Commun. 73, 164-170.

Hook,R. & Gillis,C.N. (1975) Prostaglandins 9, 193-201.

Horrobin,D.F. (1977) Prostaglandins 14, 667-677.

Horton,E.W. (1976) Sci.Prog. 63, 335-346.

Horton,E.W. & Jones,R.L. (1969) Brit.J.Pharmac. 37,705-722.

Houslay,M.D., Warren,G.B., Birdsall,N.J.M. & Metcalfe,J.C. (1975) FEBS Lett. 51, 146-151.

Jaffe,B.M. (1974) Prostaglandins 6, 453-461.

Jaffe,B.M. & Santoro,M.G. (1977) in The Prostaglandins 3 (Ramwell.P.W., Hrsg.) S.329-351, Plenum Press, New York, London.

Jarabak,J. (1969) Methods Enzymol. 15, 746-752.

Jarabak,J. (1972) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 69, 533-544.

Jarabak,J. & Braithwaite,S.S. (1976) Arch.Biochem.Biophys. 177, 245-254.

Ji,T.H. & Benson,A.A. (1968) Biochim.Biophys.Acta 150, 686-693.

Johnson,R.A., Morton,D.R., Kinner,J.H., Gorman,R.R., McGuire,J.C. & Sun,F.F. (1976) Prostaglandins 12, 915-928.

Jones,R.L. (1976) in Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 1 (Samuelsson,B. & Paoletti,R., Hrsg.) S.221-230, Raven Press, New York.

Jones,R.L. & Cammock,S. (1973) Adv.Biosci. 9, 61-70.

Jung,A., Schlegel,W., Jackisch,R., Friedrich,E.J., Wendel, A. & Rückrich,M.F. (1975) Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 356, 787-798.

Kadowitz,P.J. & Hyman,A.L. (1975) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 149, 282-286.

Kalckar,H.M. (1947) J.Biol.Chem. 167, 461-475.

Kaplan,L., Lee,S.-C. & Levine,L. (1975) Arch.Biochem.Biophys. 167, 287-293.

Keirse,M.J.N.C. & Turnbull,A.C. (1973) J.Obstet.Gynaec. Brit.Commonw. 80, 970-973.

Keirse,M.J.N.C. & Turnbull,A.C. (1975) Brit.J.Obstet. Gynaec. 82, 887-893.

Keirse,M.J.N.C. & Turnbull,A.C. (1976) Brit.J.Obstet. Gynaec. 83, 146-151.

Keirse,M.J.N.C., Flint,A.P.F. & Turnbull,A.C. (1974) J.Obstet.Gynaec.Brit.Commonw. 81, 131-135.

Keirse,M.J.N.C., Hanssens,M.C.A.J.A., Hicks,B.R. & Turnbull,A.C. (1976) Eur.J.Obstet.Gynaec.Reprod.Biol. 6, 1-6.

Keirse,M.J.N.C., Hicks,B.R. & Turnbull,A.C. (1976) Brit.J. Obstet.Gynaec. 83, 152-155.

Kenimer,G.J., Goldberg,V. & Blecher,M. (1977) in The Prostaglandins 3 (Ramwell,P.W., Hrsg.) S.77-108, Plenum Press, New York, London.

Kepp,R. (1976) Geburtsh. u. Frauenheilk. 36, 700-705.

Kibbey,W.E., Bronn,D.G. & Minton,J.P. (1977) Prostaglandins 13, 1023-1032.

Kiefer,H.C., Johnson,C.R. & Arora,K.L. (1975) Anal.Biochem. 68, 336-339.

Kimball,F.A., Landerdale,J.W., Nelson,N.A. & Jackson,R.W. (1976) Prostaglandins 12, 985-995.

Kindahl,H. (1977) Prostaglandins 13, 619-629.

Kirton.K.T., Wyngarden,L.J. & Bergstrom,K.K. (1973) Adv. Biosci. 9, 651-655.

Kirton,K.T., Kimball,F.A. & Porteus,S.E. (1976) in Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 2 (Samuelsson,B. & Paoletti,R., Hrsg.) S.621-625, Raven Press, New York.

Kloeze,J. (1969) Biochim.Biophys.Acta 187, 285-292.

Kolata,G.B. (1975) Science 190, 770-771 + 812.

König,R., Stegemann,H., Francksen,H. & Paul,H.L. (1970) Biochim.Biophys.Acta 207, 184-189.

Kröner,E.E. & Peskar,B.A. (1976) Experientia 32, 1114-1115.

Kuehl,F.A.,Jr., Cirillo,V.J., Ham,E.A. & Humes,J.L. (1973) Adv.Biosci. 9, 155-172.

Kuehl,F.A.,Jr., Humes,J.L., Egan,R.W., Ham,E.A., Beveridge, G.C. & van Arman,C.G. (1977) Nature 265, 170-173.

Labhsetwar,A.P. (1972) Prostaglandins 2, 23-31.

Labhsetwar,A.P. (1974) Fed.Proc. 33, 61-77.

Langs,D.A., Erman,M. & DeTitta,G.T. (1977) Science 197, 1003-1005.

Lazdunski,M. (1972) Curr.Top.Cell.Reg. 6, 267-309.

Leary,W.P., Asmal,A.C. & Botha,J. (1977) Prostaglandins 13, 697-700.

Lee,A.G. (1977) TIBS 2, 231-233.

Lee,J.B. (1972) Prostaglandins 1, 55-70.

Lee,S.-C. & Levine,L. (1974a) J.Biol.Chem. 249, 1369-1375.

Lee,S.-C. & Levine,L. (1974b) Biochem.Biophys.Res.Commun. 61, 14-21.

Lee,S.-C. & Levine,L. (1975) J.Biol.Chem. 250, 548-552.

Lee,S.-C., Pong,S.-S., Katzen,D., Wu,K.-Y. & Levine,L. (1975) Biochemistry 14, 142-145.

Lee,C.-Y., Lappi,D.A., Wermuth,B., Everse,J. & Kaplan,N.O. (1974) Arch.Biochem.Biophys. 163, 561-569.

Levine,L. (1977) Brandeis University, persönliche Mitteilungen.

Limas,C.J. (1977) Biochim.Biophys.Acta 498, 306-315.

Limas,C.J. & Cohn,J.N. (1973) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 142, 1230-1234.

Lineweaver,H. & Burk,D. (1934) J.Amer.Chem.Soc. 56,658-666.

Losert,W. (1975) Arzneim.-Forsch. 25, 135-148.

Makino,S., Reynolds,J.A. & Tanford,C. (1973) J.Biol.Chem. 248, 4926-4932.

Malmsten,C. (1976) Life Sci. 18, 169-176.

Manku,M.S. & Horrobin,D.F. (1976) Prostaglandins 12, 369-376.

Marrazzi,M.A. & Andersen,N.H. (1974) in The Prostaglandins 2 (Ramwell,P.W., Hrsg.) S.99-155, Plenum Press, New York, London.

Marrazzi,M.A. & Matschinsky,F.M.(1972) Prostaglandins 1, 373-388.

Mathé,A.A. (1977) in The Prostaglandins 3 (Ramwell,P.W., Hrsg.) S.169-224, Plenum Press, New York, London.

Matschinsky,F.M., Shanahan,D. & Ellerman,J. (1974) Anal. Biochem. 60, 188-199.

Maurer,H.R. (1971) Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamid Gel Electrophoresis, W. de Gruyter, Berlin, New York.

Menzel,H.M. & Hammes,G.G. (1973) J.Biol.Chem. 248, 4885-4889.

Meyers,M.B. & Swislocki,N.J. (1974) Arch.Biochem.Biophys. 164, 544-550.

Miller,O.V., Johnson,R.A. & Gorman,R.R. (1977) Prostaglandins 13, 599-609.

Mills,D.C.B. & MacFarlane,D.E. (1974) Thrombosis Res. 5, 401-412.

Miyamoto,T., Yamamoto,S. & Hayaishi,O. (1974) Proc.Nat. Acad.Sci. USA 71, 3645-3648.

Moncada,S., Gryglewski,R., Bunting,S. & Vane,J.R. (1976) Nature 263, 663-665.

Moncada,S., Higgs,E.A. & Vane,J.R. (1977) Lancet i, 18-21.

Morris,C.J.O.R. (1976) TIBS 1, N207-N208.

Morris,C.J.O.R. (1977) TIBS 2, N16.

Murphey,W.H., Kitto,G.B., Everse,J. & Kaplan,N.O. (1967) Biochemistry 6, 603-609.

Nagasawa,M., Chan,J.A. & Sih,C.J. (1974) Prostaglandins 8, 221-230.

Nakano,J., Änggard,E. & Samuelsson,B. (1969) Eur.J.Biochem. 11, 386-389.

Needleman,P., Moncada,S., Bunting,S., Vane,J.R., Hamberg, M. & Samuelsson,B. (1976) Nature 261, 558-560.

Nelson,N.A. (1974) J.Med.Chem. 17, 911-918.

Nishizawa,E.E., Miller,W.L., Gorman,R.R., Bundy,G.L., Svensson,J. & Hamberg,M. (1975) Prostaglandins 9, 109-121.

Nomura,T. & Ogata,H. (1976) Biochim.Biophys.Acta 431, 127-131.

Nugteren,D.H. & Hazelhof,E. (1973) Biochim.Biophys.Acta 326, 448-461.

O'Brien,P.J. & Rahimtula,A. (1976) Biochem.Biophys.Res. Commun. 70, 832-838.

O'Carra,P. (1974) Biochem.Soc.Trans. 2, 1289-1294.

Oelz,O., Oelz,R., Knapp,H.R., Sweetman,B.J. & Oates,H.R. (1977) Prostaglandins 13, 225-234.

Ojeda,S.R., Jameson,H.E. & McCann,S.M. (1976) Prostaglandins 12, 281-301.

Oliw,E., Lundén,I. & Änggard,E. (1976) in Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 1 (Samuelsson,B. & Paoletti,R., Hrsg.) S.147-151, Raven Press, New York.

Omini,C., Moncada,S. & Vane,J.R. (1977) Prostaglandins 14, 625-632.

Pace-Asciak,C. (1975) J.Biol.Chem. 250, 2795-2800.

Pace-Asciak,C. (1976) Nature 263, 510-512.

Pace-Asciak,C. & Domazet,Z. (1975) Biochim.Biophys.Acta 380, 338-343.

Pace-Asciak,C., Morawska,K. & Wolfe,L.S. (1970) Biochim. Biophys.Acta 218, 288-295.

Peskar,B.M., Holland,A. & Peskar,B.A. (1976) J.Pharm. Pharmac. 28, 146-148.

Pettersson,G. (1972) Biochim.Biophys.Acta 276, 1-11.

Pharris,B.B. & Behrman,H.R. (1973) in The Prostaglandins 1 (Ramwell,P.W., Hrsg.) S.347-363, Plenum Press, New York, London.

Pinto,J.T. & Frissel,W.R. (1975) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 148, 981-985.

Pike,J.E. (1971) Scient.Am. 225, 84-92.

Piper,P.J., Vane,J.R. & Wyllie,J.H. (1970) Nature 225, 600-604.

Polet,H. & Levine,L. (1975a) J.Biol.Chem. 250, 351-357.

Polet,H. & Levine,L. (1975b) Arch.Biochem.Biophys. 168, 96-103.

Pong,S.-S. & Levine,L. (1977) in The Prostaglandins 3 (Ramwell,P.W., Hrsg.) S.41-76, Plenum Press, New York, London.

Powell,W.S., Hammarström,S. & Samuelsson,B. (1975) Eur.J. Biochem. 56, 73-77.

Powell,W.S., Hammarström,S. & Samuelsson,B. (1976) Eur.J. Biochem. 61, 605-611.

Puglisi,L. (1973) Adv.Biosci. 9, 219-227.

Puri,C.P., Rahman,S.A., Jain,A.K., Bhaduri,R., Singh,C.M., Hingorani,V. & Laumas,K.R. (1976) Prostaglandins 11, 905-923.

Ramwell,P.W. (1973,1974,1977) The Prostaglandins 1-3, Plenum Press, New York, London.

Rao,C.V. (1975a) Biochem.Biophys.Res.Commun. 64, 416-424.

Rao,C.V. (1975b) Biochem.Biophys.Res.Commun. 67, 1242-1250.

Raz,A., Schwartzman,M. & Kenig-Wakshal,R. (1976) Eur.J. Biochem. 70, 89-96.

Renard,M. & Fersht,A.R. (1973) Biochemistry 12, 4713-4718.

Reynard,A.M., Hass,L.F., Jacobsen,D.D. & Boyer,P.D. (1961) J.Biol.Chem. 236, 2277-2283.

Reynolds,J.A. & Tanford,C. (1970) J.Biol.Chem. 245, 5161-5165.

Robert,A. (1977) in The Prostaglandins 3 (Ramwell,P.W., Hrsg.) S.225-266, Plenum Press, New York, London.

Rose,J.C., Kot,P.A., Ramwell,P.W., Doykos,M. & O'Neill,W.P. (1976) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 153, 209-212.

Roseman,T.J., Sims,B. & Stehle,R.G. (1973) Adv.Biosci. 9, 851-852.

Rosengren,J., Pahlman,S., Glad,M. & Hjertén,S. (1975) Biochim.Biophys.Acta 412, 51-61.

Rückrich,M.F. (1974) Biochem. Diplomarbeit, Univ. Tübingen.

Rückrich,M.F., Wendel,A., Schlegel,W., Jackisch,R. & Jung,A. (1975) Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 356, 799-809.

Rückrich,M.F., Schlegel,W. & Jung,A. (1976a) FEBS Lett. 68, 59-62.

Rückrich,M.F., Wendel,A., Schlegel,W., Jackisch,R. & Jung,A. (1976b) in Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 1 (Samuelsson,B. & Paoletti,R., Hrsg.) S.153-157, Raven Press, New York.

Rudolph,F.B. & Fromm,H.J. (1970) Biochemistry 9, 4660-4665.

Ryan,J.W., Niemeyer,R.S. & Ryan,U. (1975) Prostaglandins 10, 101-108.

Saintot,M., Thaler-Dao,H., Descomps,B. & Crastes de Paulet, A. (1976) FEBS Lett. 72, 238-242.

Salomon,J.A. & Amy,J.-J. (1973) Prostaglandins 4, 523-533.

Samuelsson,B. (1965) Angew.Chem. 77, 445-452.

Samuelsson,B., Granström,E., Gréen,K., Hamberg,M. & Hammarström,S. (1975) Ann.Rev.Biochem. 44, 669-695.

Schaffner,W. & Weissmann,C. (1973) Anal.Biochem. 56, 502-514.

Schärfe,J. (1977) Univ. Tübingen, persönliche Mitteilungen.

Schimerlick,M.J. & Cleland,W.W. (1973) J.Biol.Chem. 248, 8418-8423.

Schlegel,W. & Greep,R.O. (1975) Eur.J.Biochem. 56, 245-252.

Schlegel,W., Demers,L.M., Hildenbrandt-Stark,H.E., Behrman,H.R. & Greep,R.O. (1974) Prostaglandins 5, 417-433.

Schwendimann,B., Ingbar,D. & Bernhard,S.A. (1976) J.Mol. Biol. 108, 123-128.

Segel,I.H. (1975) Enzyme Kinetics, Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems, Wiley-Interscience Publication, New York, London, Sidney.

Seyberth,H.W., Hubbard,W.C., Oelz,O., Sweetman,B.J., Watson,J.T. & Oates,J.A. (1977) Prostaglandins 14, 319-331.

Shaltiel,S. (1974) Methods Enzymol. 34B, 126-140.

Sharma,S.D. & Hale,R.W. (1975) Contraception 12, 445-452.

Shaw,J.E. & Ramwell,P.W. (1969) Meth.Biochem.Anal. 17, 325-371.

Shio,H., Ramwell,P.W., Andersen,N.H. & Corey,E.J. (1970) Experientia 26, 355-357.

Siliski,J.M. & Colman,R.F. (1974) Biochim.Biophys.Acta 370, 1-25.

Smith,J.B.,Silver,M.J., Ingerman,C.M. & Kocsis,J.J. (1974) Thrombosis Res. 5, 291-299.

Stein,A.M., Lee,J.K., Anderson,C.D. & Anderson,B.M. (1963) Biochemistry 2, 1015-1017.

Stone,K.J. & Hart,M. (1975) Prostaglandins 10, 273-288.

Strandberg,K. & Tuvemo,T. (1975) Acta Physiol.Scand. 94, 319-326.

Sun,F.F. (1976) The Upjohn Company, Kalamazoo, persönliche Mitteilungen.

Sun,F.F. & Armour,S.B. (1974) Prostaglandins 7, 327-338.

Sun,F.F., Armour,S.B., Bockstanz,V.R. & McGuire,J.C. (1976) in Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 1 (Samuelsson,B. & Paoletti,R., Hrsg.) S.163-169, Raven Press, New York.

Svensson,J., Hamberg,M. & Samuelsson,B. (1975) Acta Physiol.Scand. 94, 222-228.

Svensson,J., Strandberg,K., Tuvemo,T. & Hamberg,M. (1977) Prostaglandins 14, 425-436.

Tai,H.-H. (1976) Biochem.J. 160, 577-581.

Tai,H.-H. & Hollander,C.S. (1976a) in Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 1 (Samuelsson,B. & Paoletti,R., Hrsg.) S.171-175, Raven Press, New York.

Tai,H.-H. & Hollander,C.S. (1976b) Biochem.Biophys.Res. Commun. 68, 814-820.

Tai,H.-H., Tai,C.L. & Hollander,C.S. (1974) Biochem.Biophys.Res.Commun. 57, 457-462.

Tashjian,A.H.,Jr., Voelkel,E.F., Goldhaber,P. & Levine,L. (1974) Fed.Proc. 33, 81-86.

Tashjian,A.H.,Jr., Tice,J.E. & Sides,K. (1977a) Nature 266, 645-647.

Tashjian,A.H.,Jr., Voelkel,E.F. & Levine,L. (1977b) Prostaglandins 14, 309-317.

Tateson,J.E., Moncada,S. & Vane,J.R. (1977) Prostaglandins 13, 389-397.

Thaler-Dao,H., Saintot,M., Baudin,G., Descomps,B. & Crastes de Paulet,A. (1974) FEBS Lett. 48, 204-208.

Thaler-Dao,H., Saintot,M., Baudin,G., Descomps,B. & Crastes de Paulet,A. (1976) in Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 1 (Samuelsson,B. & Paoletti,R., Hrsg.) S. 177-182, Raven Press, New York.

Tuvemo,T. & Wide,L. (1973) Prostaglandins 4, 689-694.

Tuvemo,T., Strandberg,K., Hamberg,M. & Samuelsson,B. (1976) Acta Physiol.Scand. 96, 145-149.

Vane,J.R. (1971) Nature New Biol. 231, 232-235.

Villee,C.A. (1962) Biochem.J. 83, 191-194.

Wasserman,M.A. (1975) Prostaglandins 9, 959-973.

Wasserman,M.A. (1976) Eur.J.Pharmac. 36, 103-114.

Weber,U. (1973) Med.Monatsschrift 27, 290-295.

Weeks,J.R. (1972) Ann.Rev.Pharmac. 12, 317-336.

Weeks,J.R., DuCharme,D.W., Magge,W.E. & Miller,W.L. (1973) J.Pharmac.Exp. 186, 67-74.

Westbrook,C. & Jarabak,J. (1975) Biochem.Biophys.Res. Commun. 66, 541-546.

Wilkinson,G.W. (1961) Biochem.J. 80, 324-332.

Wilks,J.W. (1977) Prostaglandins 13, 161-170.

Willman,E.A. & Collins,W.P. (1976) J.Endocrin. 69, 413-419.

Wilschut,J.C., Regts,J. & Scherphof,G. (1976) FEBS Lett. 63, 328-332.

Wlodawer,P. & Samuelsson,B. (1973) J.Biol.Chem. 248, 5673-5678.

Wlodawer,P., Kindahl,H. & Hamberg,M. (1976) Biochim.Biophys.Acta 431, 603-614.

Wolfe,L.S., Rostworowski,K. & Marion,J. (1976) Biochem. Biophys.Res.Commun. 70, 907-913.

Wratten,C.C. & Cleland,W.W. (1963) Biochemistry 2, 935-941.

Wratten,C.C. & Cleland,W.W. (1965) Biochemistry 4, 2442-2451.

Yamazaki,M. & Sasaki,M. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun. 66, 255-261.

Yankee,E.W., Ayer,D.E., Bundy,G.L., Lincoln,F.H., Miller, W.L. & Youngdale,G.A. (1976) in Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 1 (Samuelsson,B. & Paoletti,R., Hrsg.) S.195-203, Raven Press, New York.

Zahn,V. & Johannigmann,J. (1975) Geburtsh. u. Frauenheilk. 35, 203-210.

Zewe,V. & Fromm,H.J. (1965) Biochemistry 4, 782-792.

LEBENSLAUF

Michael Franz Rückrich
geb. am 7.3.1948 in Bad Kreuznach
Eltern: Herbert Rückrich, Kaufmann
Katharina Rückrich geb. Bauer

1954 - 1958: Volksschule (Bad Kreuznach)
1958 - 1966: Mathem.-Naturwiss. Abteilung des Staatlichen Gymnasiums in Bad Kreuznach
Reifezeugnis am 21.10.1966
1966 - 1967: Chemiestudium an der Universität Mainz
1967 - 1974: Biochemiestudium an der Universität Tübingen
Erster Teil des Vordiploms im April 1968,
zweiter Teil des Vordiploms im April 1970,
Diplomprüfung im April 1973, Diplomarbeit
von Mai 1973 bis Mai 1974.

Die Experimente zur vorliegenden Dissertation "NAD-abhängige 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase aus Humanplacenta. Isolierung, Charakterisierung und enzymkinetische Studien zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus" wurden im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen von Juni 1974 bis Mai 1977 bei Herrn Prof. Dr. J. Guglielmi durchgeführt.

Meine akademischen Lehrer waren:

Anatomie:	K.Mörike
Anorganische Chemie:	W.Rüdorff
Botanik:	H.Metzner, E.Bünning
Genetik:	W.Seyffert
Mathematik:	W.Schweizer
Mikrobiologie:	H.Zähner, H.Diekmann
Organische Chemie:	E.Bayer, E.Müller, G.Opitz
Pflanzenphysiologie:	H.Metzner
Pharmakologie:	H.Remmer
Physik:	H.Krüger
Physikalische Chemie:	H.Mauser, G.Kortüm
Physiologische Chemie:	G.Weitzel, J.Guglielmi
Zoologie:	F.Möhres